

UNIVERSITAT DE LLEIDA



ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRÀRIA

TREBALL FINAL DE MÀSTER

Titulació: Màster en Enginyeria Agronòmica

**Estudi de la possible resistència a l'herbicida
bromoxinil en un biotip de rosella (*Papaver rhoeas*)**

Tutor: Dr. Joel Torra Farré

Autor: Josep Oriol Cuñé Solà

Lleida, juny de 2019

AGRAÏMENTS

En primer lloc, voldria donar-li les gràcies al meu tutor del projecte final de màster, el Doctor Joel Torra Farré, per l'ajuda que m'ha proporcionat per fer aquest treball. Sé que has tingut molta feina durant tots aquests mesos, però tot i així sempre has mostrat una gran disponibilitat per orientar-me en les diferents parts del treball i en la seva supervisió.

També voldria mostrar el meu agraïment a la Soraya Martin per la seva disponibilitat i contribució en la part experimental del projecte.

I per últim, però no menys important, moltes gràcies a la meva família i amics per tots els consells i ànims que m'han aportat durant el desenvolupament d'aquest treball.

RESUM

La rosella (*Papaver rhoeas*) és la mala herba dicotiledònia més comuna i problemàtica en els cereals d'hivern del sud d'Europa. Al nord-est d'Espanya es troba al 39% dels camps dedicats a la producció de cereals. És una espècie competitiva i difícil de controlar, i en funció de la seva densitat provoca reduccions significatives del rendiment del cultiu fins un 32%. Com a conseqüència de la sistemàtica aplicació d'herbicides per al seu control s'han seleccionat biotips resistents a dos modes d'acció d'herbicides, als inhibidors de l'ALS o grup B (a la sulfonilurea tribenuron-metil) i a les auxines sintètiques o grup O (a l'àcid fenoxiacètic 2,4-D), i recentment, s'han detectat alguns problemes amb el control de rosella amb barreges que contenen herbicides del grup C3 (nitrils) com és el bromoxinil. Aquest treball es basa en estudiar si la problemàtica amb el control de rosella amb bromoxinil és deguda a una possible resistència múltiple a l'herbicida que es pot trobar en un biotip de rosella i esbrinar la potencial funció de l'enzim citocrom P450 en la resistència a aquest herbicida, o si és deguda a la realització de les aplicacions en uns moments en els quals la mala herba es mostra més tolerant a l'herbicida.

Per fer l'assaig es van utilitzar quatre poblacions de rosella diferents: la població B-013 que està caracteritzada per presentar uns nivells baixos de tolerància a l'herbicida bromoxinil i per presentar resistència als herbicides inhibidors de l'enzim ALS (grup B) i a les auxines sintètiques (grup O); la població B-017 la qual es va obtenir de la pol·linització creuada de forma controlada entre plantes de la població B-016, que és descendent de la població B-013 que havia sobreviscut a l'aplicació d'1 l/ha de bromoxinil; i les poblacions HS-S07 i B-S113 que són poblacions estàndards sensibles. Les plantes d'aquestes quatre poblacions es van classificar en dos estats fenològics ben diferenciats: 1^a fenologia (14-16 BBCH) on les plantes es van tractar només amb bromoxinil i 2^a fenologia (16-18 BBCH) on a més, la meitat dels testos es van tractar prèviament amb un insecticida inhibidor del citocrom P450, abans d'aplicar el bromoxinil. Després de 28 dies d'haver aplicat els productes es va procedir a fer el mostreig per avaluar el percentatge de supervivència, i el percentatge de reducció del pes fresc i el pes sec i es va efectuar l'anàlisi de les dades.

Els resultats obtinguts d'aquest treball van confirmar que no hi ha resistència a l'herbicida bromoxinil en les poblacions estudiades B-013 i B-017, i que a més, no és un caràcter heretable. Un factor que si que es va confirmar és que les plantes amb un estat fenològic més avançat es comporten de manera més tolerant a l'herbicida

bromoxinil. Pel que fa referència a l'aplicació de l'insecticida malatí, no es podria considerar que el citocrom P450 estigui involucrat en la resposta tolerant al bromoxinil (la possible degradació del bromoxinil) en les quatre poblacions de rosella estudiades, ja que en aquest assaig no es va observar que el malatí provoqués una alteració del fenotip de les plantes de més tolerants a més sensibles.

A nivell econòmic s'ha observat que el moment d'aplicació de l'herbicida bromoxinil és important per obtenir la màxima eficàcia del producte amb el mínim cost possible, ja que el fet d'executar el tractament en un estadi fenològic avançant ens pot incrementar el cost del tractament, a més de la pèrdua d'eficàcia.

RESUMEN

La amapola (*Papaver rhoeas*) es la mala hierba dicotiledónea más común y problemática en los cereales de invierno del sur de Europa. Al noreste de España se encuentra en el 39% de los campos destinados a la producción de cereales. Es una especie competitiva y difícil de controlar, y en función de su densidad provoca reducciones significativas del rendimiento del cultivo de hasta un 32%. Como consecuencia de la sistemática aplicación de herbicidas para su control se han seleccionado biotipos resistentes a dos modos de acción de herbicidas, a los inhibidores de la ALS o grupo B (a la sulfonilurea tribenurón-metil) y a las auxinas sintéticas o grupo O (al ácido fenoxiacético 2,4-D), y recientemente, se han detectado algunos problemas con el control de amapola con mezclas que contienen herbicidas del grupo C3 (nitrilos) como es el bromoxinil. Este trabajo se basa en estudiar si la problemática con el control de amapola con bromoxinil es debida a una posible resistencia múltiple al herbicida que se puede encontrar en un biotipo de amapola y averiguar la potencial función del enzima citocromo P450 en la resistencia a este herbicida, o si es debida a la realización de las aplicaciones en unos momentos en los cuales la mala hierba se muestra más tolerante al herbicida.

Para desempeñar el ensayo se utilizaron cuatro poblaciones de amapola diferentes: la población B-013 que está caracterizada por presentar unos niveles bajos de tolerancia al herbicida bromoxinil y por presentar resistencia a los herbicidas inhibidores del enzima ALS (grupo B) y a las auxinas sintéticas (grupo O); la población B-017 la cual se obtuvo de la polinización cruzada de forma controlada entre plantas de la población B-016, que es descendiente de la población B-013 que había sobrevivido a la aplicación de 1 l/ha de bromoxinil; y las poblaciones HS-S07 y B-S113 que son poblaciones estándares sensibles. Las plantas de estas cuatro poblaciones se clasificaron en dos estados fenológicos bien distintos: 1ª fenología (14-16 BBCH) donde las plantas se trataron sólo con bromoxinil y 2ª fenología (16-18 BBCH) donde además, la mitad de las macetas se trataron previamente con un insecticida inhibidor del citocromo P450, antes de aplicar el bromoxinil. Después de 28 días de haber aplicado los productos se procedió a realizar el muestreo para evaluar el porcentaje de supervivencia, el porcentaje de reducción del peso fresco y del peso seco, y se realizó el análisis de los datos.

Los resultados obtenidos de este trabajo confirmaron que no hay resistencia al herbicida bromoxinil en las poblaciones estudiadas B-013 y B-017, y que además, no es un carácter heredable. Un factor que sí que se confirmó es que las plantas con un

estado fenológico más avanzado se comportan de forma más tolerante al herbicida bromoxinil. Por lo que hace referencia a la aplicación del insecticida malatión, no se podría considerar que el citocromo P450 esté involucrado en la respuesta tolerante al bromoxinil (la posible degradación del bromoxinil) en las cuatro poblaciones de amapola estudiadas, ya que en este ensayo no se observó que el malatión produjera una alteración del fenotipo de las plantas de más tolerantes a más sensibles.

A nivel económico se ha observado que el momento de aplicación del herbicida bromoxinil es importante para obtener la máxima eficacia del producto con el mínimo coste posible, ya que el hecho de realizar el tratamiento en un estado fenológico avanzado nos puede incrementar el coste del tratamiento, además de la pérdida de eficacia.

SUMMARY

The corn poppy (*Papaver rhoeas*) is the most common and problematic dicotyledon weed of winter cereal crops in Southern Europe. In the northeast of Spain it is found in 39% of the fields destined to cereal production. It is a competitive species difficult to control, and depending on its density causes significant reductions in crop yield up to 32%. As a consequence of the systematic applications of herbicides in order to control it, resistant biotypes to two herbicide mode of action have been selected, ALS or group B inhibitors (to the sulfonylurea tribenuron-methyl) and/or synthetic auxins or group O (to the phenoxyacetic acid 2,4-D), and recently, some problems have been detected with the control of corn poppy with mixtures containing herbicides of the group C3 (nitriles) such as bromoxynil. This work aims to study if the problem with control of corn poppy with bromoxynil is due to possible multiple resistance to this herbicide that can be found in a corn poppy biotype and to find out the potential function of the cytochrome P450 enzyme in the resistance to this herbicide, or if it is due to the realization of the applications at a time when the weeds are more tolerant to the herbicide.

Four different corn poppy populations were used to perform the trial: B-013 population, which is characterized by low levels of tolerance to the bromoxynil herbicide and resistant to herbicides that inhibit the ALS enzyme (group B) and synthetic auxins (group O); B-017 population which was obtained from the cross-pollination in a controlled manner between plants of the B-16 population, which is a descendant of B-013 population that had survived an application of 1 l/ha of bromoxynil; and the HS-S07 and B-S113 populations that are susceptible standard populations. The plants of these four populations were classified into two very different phenological stages: 1st phenology (14-16 BBCH) where the plants were treated only with bromoxynil, and 2nd phenology (16-18 BBCH) where, in addition, half of the pots were treated previously with an insecticide inhibitor of cytochrome P450 enzyme, before applying bromoxynil. 28 days after the applications, the sampling was carried out to evaluate the percentage of survival, and the percentage of reduction of fresh and dry weights and data analysis was performed.

The results obtained from this work confirmed that there isn't resistance to the bromoxynil herbicide in the studied populations B-013 and B-017, and that, moreover, it isn't a heritable character. One factor that has been confirmed is that plants with a more advanced phenological state behave more tolerant to the bromoxynil herbicide. With regard to the application of the insecticide malathion, cytochrome P450 couldn't be considered to be involved in the tolerance response to bromoxynil (the possible

degradation of bromoxynil) in the four poppy populations studied, since in this trial malathion did not produce an alteration of the phenotype of the plants from more tolerant to more sensitive.

From an economic point of view, it has been observed that the time of application of the bromoxynil herbicide is important to obtain the maximum efficacy of the product with the minimum possible cost, since the fact of carrying out the treatment in an advanced phenological stage can increase the cost of the treatment, in addition to the loss of effectiveness.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	14
1.1. Importància de les males herbes en els sistemes agrícoles.....	14
1.2. Els herbicides i la resistència a herbicides.....	15
1.2.1. Tipus de resistències	19
1.3. <i>Papaver rhoeas</i>	21
1.3.1. Característiques biològiques de l'espècie	21
1.3.2. La rosella en els cereals d'hivern.....	22
1.3.3. Resistència a herbicides en la rosella.....	22
1.3.3.1. Resistència a 2,4 D.....	23
1.3.3.2. Resistència a tribenuron-metil.....	23
1.3.3.3. Problemes amb bromoxinil.....	24
2. OBJECTIUS	26
3. MATERIAL I MÈTODES	27
3.1. Material vegetal	27
3.2. Mètodes de propagació	28
3.3. Experiment dosis-resposta	30
3.4. Dades	31
3.5. Anàlisi estadística	32
4. RESULTATS	33
4.1. Resultats: Estudi econòmic.....	48
5. DISCUSSIÓ	49
5.1. Discussió: Estudi econòmic	54
6. CONCLUSIONS	56
7. ANNEX	57
8. BIBLIOGRAFIA.....	60

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1: Els herbicides imposen una pressió de selecció i poden provocar canvis a les diferents espècies de males herbes, que fa que quedin com a resultat una flora dominada per espècies més tolerants (A). A vegades una mala herba individual té una mutació que produeix resistència a un herbicida o grup d'herbicides, i aquest individu sobreviu i es reproduceix tot i estar tractat amb herbicides (B). En els dos casos, després de diferents generacions i selecció repetida amb els mateixos o herbicides similars, l'espècie tolerant o biotip resistent pot arribar a ser dominant dins de la població (Orloff et al., 2009).....	18
Figura 2: Mostra de dues safates d'alumini utilitzades per la germinació de les llavors de quatre poblacions de <i>Papaver rhoeas</i>	28
Figura 3: Càmera de germinació utilitzada per la germinació de les quatre poblacions de <i>Papaver rhoeas</i>	28
Figura 4: Transplantament de les plàntules germinades, de les safates als testos.....	29
Figura 5: Testos on hi ha les plàntules trasplantades ja ubicats a l'hivernacle. La foto de l'esquerra és del moment del transplantament de les plàntules de segona fenologia. I, la de la dreta, de les plàntules de primera fenologia.....	30
Figura 6: Foto de les plàntules en el moment del tractament. El test de l'esquerra mostra les plàntules en un estat fenològic 14-16 BBCH (1 ^a fenologia) i el test de la dreta mostra les plàntules en un estat fenològic 16-18 BBCH (2 ^a fenologia).....	30
Figura 7: Gràfiques on es mostren els ajustos sigmoïdals per supervivència (gràfiques superiors) i per % de la reducció del pes fresc (gràfiques inferiors) de les poblacions sensibles HS-S07 i B-S113 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1 ^a fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2 ^a fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatió en plantes de 2 ^a fenologia, triangles negres i línia discontinua.....	38

Figura 8: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 1 ^a fenologia tractades amb bromoxinil de les poblacions sensibles HS-S07 i B-S113.....	39
Figura 9: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2 ^a fenologia tractades amb bromoxinil de les poblacions sensibles HS-S07 i B-S113.....	39
Figura 10: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2 ^a fenologia tractades amb bromoxinil + malatió de les poblacions sensibles HS-S07 i B-S113.....	40
Figura 11: Gràfiques on es mostren els ajustos sigmoïdals per supervivència (gràfica superior) i per % de la reducció del pes fres (gràfica inferior) de la població tolerant B-013 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1 ^a fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2 ^a fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatió en plantes de 2 ^a fenologia, triangles negres i línia discontinua.....	41
Figura 12: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 1 ^a fenologia tractades amb bromoxinil de la població B-013.....	42
Figura 13: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2 ^a fenologia tractades amb bromoxinil de la població B-013.....	42
Figura 14: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2 ^a fenologia tractades amb bromoxinil + malatió de la població B-013.....	43
Figura 15: Gràfiques on es mostren els ajustos sigmoïdals per supervivència (gràfica superior) i per % de la reducció del pes fres (gràfica inferior) de la població tolerant B-017 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1 ^a fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2 ^a fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatió en plantes de 2 ^a fenologia, triangles negres i línia discontinua.....	44
Figura 16: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 1 ^a fenologia tractades amb bromoxinil de la població B-017.....	45

Figura 17: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2^a fenologia tractades amb bromoxinil de la població B-017.....45

Figura 18: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2^a fenologia tractades amb bromoxinil + malatí de la població B-017.....46

Figura 19: Gràfiques on es mostren els ajustos sigmoïdals per supervivència (gràfica superior) i per % de la reducció del pes fres (gràfica inferior) de les poblacions tolerants B-013 i B-017 per dos tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia de la població B-13, cercles negres i línia continua; Bromoxinil + malatí en plantes de 2^a fenologia de la població B-013, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia de la població B-17, triangles negres i línia fina discontinua; Bromoxinil + malatí en plantes de 2^a fenologia de la població B-017, triangles blancs i línia discontinua més gran.....47

Figura 20: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes sec de la població sensibles HS-S07 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2^a fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatí en plantes de 2^a fenologia, triangles negres i línia discontinua.....57

Figura 21: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes sec de la població sensible B-S113 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2^a fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatí en plantes de 2^a fenologia, triangles negres i línia discontinua.....58

Figura 22: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes fresc de la població tolerant B-013 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2^a fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatí en plantes de 2^a fenologia, triangles negres i línia discontinua.....58

Figura 23: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes fresc de la població tolerant B-017 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2^a fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatíó en plantes de 2^a fenologia, triangles negres i línia discontinua.....59

Figura 24: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes fresc de les poblacions tolerants B-013 i B-017 per dos tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia de la població B-13, cercles negres i línia continua; Bromoxinil + malatíó en plantes de 2^a fenologia de la població B-013, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia de la població B-17, triangles negres i línia fina discontinua; Bromoxinil + malatíó en plantes de 2^a fenologia de la població B-017, triangles blancs i línia discontinua més gran.....59

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1: Classificació dels herbicides segons el seu MOA (HRAC, 2008).....16

Taula 2: Paràmetres de les corbes sigmoïdals de les dades de supervivència (%) de dues poblacions sensibles (HS-S07 i B-S113) i dues poblacions potencialment resistents a bromoxinil (B-013 i B-017) de rosella. Es mostren els resultats de dues fenologies (primera, 1era; segona, 2ona), i per la 2ona, també amb l'aplicació prèvia de malatió.....34

Taula 3: Paràmetres de les corbes sigmoïdals de les dades de reducció del pes fresc (%) de dues poblacions sensibles (HS-S07 i B-S113) i dues poblacions potencialment resistents a bromoxinil (B-013 i B-017) de rosella. Es mostren els resultats de dues fenologies (primera, 1era; segona, 2ona), i per la 2ona, també amb l'aplicació prèvia de malatió.....36

Taula 4: Càlculs econòmics del cost d'aplicació del producte depenent de la resistència (índex de resistència) que presenten les plantes de les poblacions sensibles (HS-S07 i B-S113) i poblacions tolerants (B-013 i B-017), amb primera o segona fenologia a l'herbicida bromoxinil o a la combinació de l'herbicida bromoxinil i l'insecticida malatió amb les dades de supervivència i pes fresc.....48

Taula 5: Paràmetres de les corbes sigmoïdals de les dades de reducció del pes sec (%) de dues poblacions sensibles (HS-S07 i B-S113) i dues poblacions potencialment resistents a bromoxinil (B-013 i B-017) de rosella. Es mostren els resultats de dues fenologies (primera, 1era; segona, 2ona), i per la 2ona, també amb l'aplicació prèvia de malatió.....57

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Importància de les males herbes en els sistemes agrícoles

Des dels inicis de l'agricultura, fa uns 10.000 anys, la producció agrícola ha hagut de competir amb organismes nocius –plagues d'animals (insectes, àcars, nematodes, rosegades, llimacs i caragols, aus), patògens de plantes (virus, bacteris, fongs) i males herbes (és a dir, plantes competitives), denominades col·lectivament plagues- els quals han interferit en la qualitat i rendiment de la producció d'aliments.

Entre les principals plagues que es troben destaquen les males herbes, ja que causen les majors pèrdues de rendiment a nivell mundial (Oerke, 2006). Es considera mala herba la planta que creix en llocs no desitjats i que interfereix en els interessos de l'home (Anderson, 1996).

Per això, des de que l'home es va fer agricultor va tenir la necessitat d'eliminar les males herbes, ja que a l'alterar el sistema i cultivar una sola espècie en una àrea determinada aquestes produïen danys als cultius.

Els danys produïts per les males herbes es divideixen en dos grans grups: danys directes i danys indirectes. Els danys directes són els que estan relacionats amb l'economia de l'agricultor, l'augment dels costos de producció, la disminució de les collites i les pèrdues de la qualitat d'aquestes (Radosevich et al., 1997). Les males herbes, al ser resistents i vigoroses en el seu hàbit de creixement, creixen molt més ràpid que els cultius i mostren competència amb aquests per l'aigua, els nutrients i la llum (Oerke, 2006), el que produeix grans pèrdues en els seus rendiments. Les males herbes també poden causar increments en els costos de producció per fer necessàries tasques del sòl i tractaments amb herbicides més cars (les operacions de conreu que es duen a terme per controlar les males herbes s'estima que suposen un 30% del cost total de la producció de cultius) o reduir el valor de la terra a causa de les invasions de males herbes en els casos més severs (Rey-Caballero et al., 2017b). A més, quan el cultiu es recol·lecta d'un camp de males herbes, les llavors de les males herbes es barregen amb el cultiu principal dificultant l'execució de les tasques agrícoles, com la collita, ja que poden arribar a obstruir la maquinària o afectar la qualitat del producte final si no es controlen adequadament (Norsworthy et al., 2012), fent que s'obtinguin uns preus de venda del producte més baixos.

Els danys indirectes que ocasionen són que serveixen de refugi i aliments a artròpodes (plagues) i agents causants de malalties (fongs, bacteris, virus i altres agents).

S'estima que els danys originats per les males herbes suposen un 12% de la producció agrícola mundial, ascendint aquest percentatge fins un 25-30% als països menys desenvolupats (García-Torres & Fernández-Quintanilla, 1991).

1.2. Els herbicides i la resistència a herbicides

Les males herbes han tingut un impacte negatiu des de l'inici de l'agricultura, i amb el pas del temps s'ha arribat a la mecanització i el descobriment dels herbicides. La introducció d'herbicides va canviar dràsticament la producció de molts cultius. Els primers productes químics utilitzats per al control de les males herbes van ser les sals de coure inorgàniques l'any 1900, i més tard els àcids sulfúrics (Hamill et al., 2004). El desenvolupament del 2,4-D i MCPA (herbicides de tipus hormonal), els primers herbicides descoberts, que es van començar a comercialitzar als voltants de l'any 1940, van revolucionar el control de males herbes en els cereals, demostrant als agricultors el potencial dels herbicides per al control eficaç i econòmic de les males herbes de fulla ampla de forma selectiva. A l'actualitat, s'han desenvolupat més de 200 molècules amb potencial herbicida (WSSA, 2019).

Els herbicides són substàncies químiques que ocasionen la mort de plantes o inhibeixen el seu creixement normal (Prado, 2011). Els seus principals avantatges són la seva ràpida acció, la seva versatilitat i adaptació a diferents equips d'aplicació i sistemes de cultiu i la seva potencialitat d'aplicació en grans extensions (Zimdahl, 2007).

Els herbicides es classifiquen de diferents maneres segons diferents aspectes que poden tenir en comú (Zimdahl, 2007):

- Classificació segons la selectivitat: selectius i no selectius.
- Classificació segons el mode d'acció (MOA en endavant): inhibidors de la fotosíntesi, inhibidors de la síntesi de pigments, inhibidors de la divisió cel·lular, auxines sintètiques, etc.

La classificació més acceptada mundialment és la que tenen com a base el MOA dels herbicides en les plantes, dividits en 25 grups (Taula1).

Taula 1: Classificació dels herbicides segons el seu MOA (HRAC, 2008).

Grup	Mode d'acció	Família Química
A	Inhibició de l'acetil CoA carboxilasa (ACCase)	Ariloxifenoxipropionats, ciclohexanodiones, fenilpirazolinones
B	Inhibició de l'acetolactat sintasa (ALS)	Imidazolinones, sulfonilurees, triazolopirimidines, pirimidiniltiobenzoats, sulfonilaminocarboniltrizolinones
C1	Inhibició de la fotosíntesi en el fotosistema II	Triazines, triazinones, uracils, piridazinones, fenil-carbonats
C2	Inhibició de la fotosíntesi en el fotosistema II	Urees, amides
C3	Inhibició de la fotosíntesi en el fotosistema II	Nitrils, benzotiadiazols, fenil-piridazines
D	Desviació del flux electrònic al fotosistema I	Bipiridils
E	Inhibició de la protoporfirinogen oxidasa (PPO)	Difenilèters, N-fenil-ftalamides, tiadiazols, oxadiazols, triazolinones
F1	Inhibició de la síntesi de carotenoides a nivell de la fitoenol desaturasa (PDS)	Piridazinones, nicotinanilides, altres
F2	Inhibició de la 4-hidroxifenil-piruvat-dioxigenasa (4-HPPD)	Trikenones, ixosazols, pirazols
F3	Inhibició de la síntesi de carotenoides (punt desconegut)	Triazols, isoxazolidinones, urees
G	Inhibició de la EPSP sintetasa	Glicines
H	Inhibició de la glutamina sintetasa	Àcids fosfínics
I	Inhibició del DHP (dihidropterat) sintetasa	Carbamats
K1	Inhibició de la unió dels microtúbuls de la mitosi	Dinitroanilines, fosforoamidats, piridazines, àcids benzoics
K2	Inhibició de la mitosi	Carbamats, benzilèters
K3	Inhibició de la divisió cel·lular	Cloroacetamides, carbamats, acetamides, benzamides, oxiacetamides
L	Inhibició de la síntesi de la paret cel·lular (cel·lulosa)	Nitrils, benzamides
M	Desacobladors (alteració de la membrana)	Dinitrofenols
N	Inhibició de la síntesi dels lípids (no ACCase)	Tiocarbamats, fosforoditioats, benzofurans, àcids clorocarbònics

O	Auxines sintètiques (com la acció de l'àcid indolacètic, AIA)	Àcids fenoxi-carboxílics, àcids benzoics, àcids piridin-carboxílics, àcids quinolin-carboxílics, altres
P	Inhibició de l'AIA	Ftalamats, diflufenzopirs
R/S/T/Z	Desconegut	Àcids arilamin propiònics, organoarsenicals, altres

Els herbicides són l'eina principal utilitzada per al control de les males herbes a l'agricultura moderna, i són molt eficaços a la majoria d'espècies, però no són una solució completa per al complex desafiament que representen les males herbes (Harker & O'Donovan, 2013). Una de les causes per la qual els herbicides no són una solució totalment efectiva per al control de males herbes és perquè, de vegades, de forma natural, en una població de males herbes hi ha alguns individus que tenen una característica biològica que els permet sobreviure a l'aplicació d'un herbicida determinat a diferència dels individus susceptibles. Aquesta resposta es coneix generalment com resistència, essent una característica adquirida per una població (biotip) d'una espècie que mancava d'aquesta. La resistència és l'habilitat/aptitud heretable d'una espècie vegetal a sobreviure i reproduir-se després del tractament d'un herbicida a dosis normalment letals per la mateixa espècie susceptible (HRAC (Herbicide Resistance Action Commite, 2019)). A diferència de les plantes tolerants, les resistents acostumen a sobreviure no només a la dosis d'aplicació agrícola de l'herbicida sinó a altres bastant superiors (De Prado et al., 1996). És per això que el repetit ús d'herbicides fa que la pressió de selecció sigui molt elevada i actuï com un filtre per eliminar les plantes susceptibles, deixant que sobrevisquin només les resistents (Yu & Powles, 2014). Seran per tant les plantes resistents les que produiran la majoria de llavors a la següent generació. Així, en generacions successives, s'acabarà seleccionant una majoria d'individus resistents i la població esdevindrà resistent, i llavors, l'herbicida esdevindrà ineficaç (Figura 1). Això ha contribuït a l'evolució mundial de la resistència als herbicides de les males herbes. S'assumeix que l'existència o no de resistència d'una mala herba es limita a la dosi normalment utilitzada a camp per al control d'aquesta.

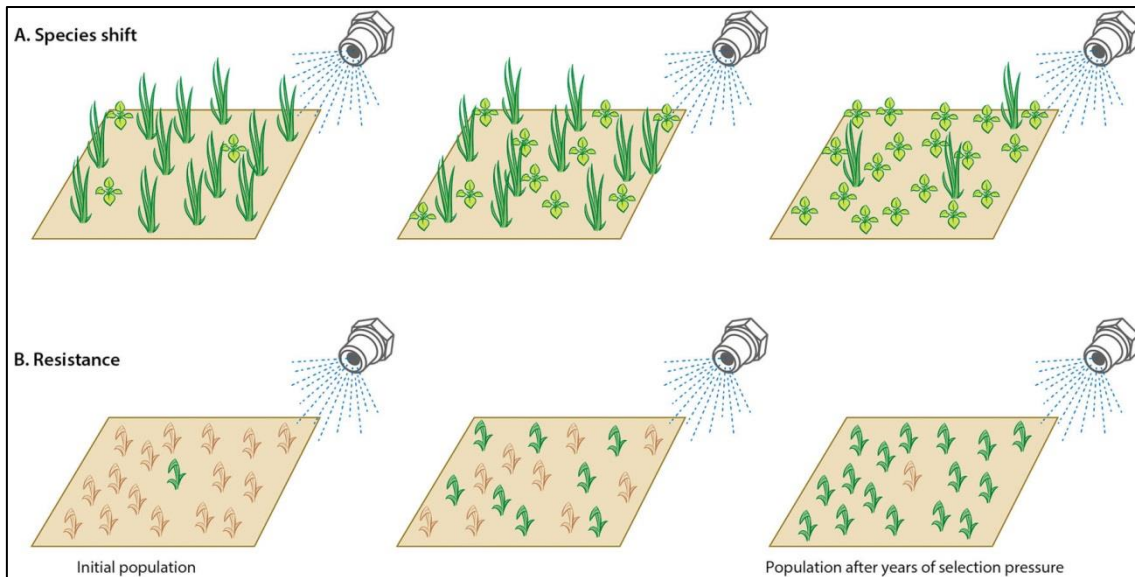


Figura 1: Els herbicides imposen una pressió de selecció i poden provocar canvis a les diferents espècies de males herbes, que fan que quedin com a resultat una flora dominada per espècies més tolerants (A). A vegades una mala herba individual té una mutació que produeix resistència a un herbicida o grup d'herbicides, i aquest individu sobreviu i es reproduïu tot i estar tractat amb herbicides (B). En els dos casos, després de diferents generacions i selecció repetida amb els mateixos o herbicides similars, l'espècie tolerant o biotip pot arribar a ser dominant dins de la població (Orloff et al., 2009).

Font: Maintaining long-term management: Herbicide resistance weeds challenge some signature cropping systems.

L'aparició de la resistència als herbicides és una preocupació important per l'agricultor degut a que altera el control de les males herbes en base a herbicides que el fan més difícil i més car. Així doncs, si una població és resistent a un herbicida, això farà que el seu control mitjançant herbicides sigui més complicat.

Les males herbes s'adapten a l'ús repetitiu d'herbicides a través de la selecció dels mecanismes de resistència que permeten la supervivència de les plantes resistents. L'evolució de la resistència als herbicides depèn de diferents factors com la intensitat de la pressió de selecció, la biologia de les espècies de males herbes i diversos factors genètics incloent la freqüència d'al·lels resistents en les poblacions de males herbes, el model d'herència de la resistència i els costos sobre l'aptitud biològica de les plantes associats a la resistència. Un altre factor que influeix en la resistència és el moment d'aplicació, ja que aplicar en un estat fenològic més avançat pot provocar que la mala herba presenti major resistència o tolerància a l'herbicida.

1.2.1. Tipus de resistències

Es diferencien dos tipus de mecanismes de resistència: la resistència creuada i la resistència múltiple (Prado, 2011).

- Resistència creuada: Es diu que hi ha resistència creuada quan un biotip ha desenvolupat resistència a dos o més herbicides degut a un sol mecanisme de resistència. Aquest fenomen s'observa freqüentment en herbicides que pertanyen a una mateixa família i que, per tant, tenen el mateix MOA (Prado, 2011).

- Resistència múltiple: Es diu que hi ha resistència múltiple quan un biotip de males herbes ha desenvolupat més d'un mecanisme de resistència a diversos herbicides amb MOA diferents (Prado, 2011).

La resistència a herbicides es desencadena mitjançant dos tipus de mecanismes: resistència en el lloc d'acció (*Target-site resistance*) i resistència fora del lloc d'acció dels herbicides (*Non-Target-site resistance*) (Diez, 2013):

- Resistència lligada al lloc d'acció: Els herbicides resulten letals per les plantes degut a la seva actuació sobre un lloc d'acció primari, generalment una proteïna, d'especial rellevància biològica. Aquest lloc acostuma a ser específic i l'acció de l'herbicida sobre aquest (efecte primari), acostuma a conduir al desenvolupament d'efectes secundaris, de naturalesa molt més general que normalment acaben produint la mort de la planta (Corbett et al., 1994). Una o diferents alteracions a la seqüència d'aminoàcids del lloc primari d'acció poden resultar en una pèrdua d'afinitat de l'herbicida per aquest, impossibilitant la unió efectiva dels dos i no impeding així la continuïtat del procés vital d'aquest lloc (Gronwald, 1994; Délye et al., 2005; Whaley et al., 2007). Aquests tipus de mecanismes, caracteritzats en la majoria dels biotips resistents descrits fins al moment, es caracteritzen per conferir un alt grau de resistència a l'herbicida utilitzat, podent estendre aquesta a altres molècules pertanyents a la mateixa família química (Cruz-Hipólito et al., 2009).

Els mecanismes de resistència en el lloc d'acció que podem trobar en les males herbes són (Yu & Powles, 2014):

- Mutació: Qualsevol canvi en la seqüència d'un nucleòtid o en l'organització de l'ADN (genotip) d'un ésser viu, que produeix una variació en les característiques d'aquest (Yu & Powles, 2014).

- **Sobreexpressió:** Es dona una amplificació de gens o canvis en el gen promotor. És a dir, la planta produeix tanta proteïna que encara que l'herbicida l'inactiva, li queda suficient perquè la planta pugui funcionar (Yu & Powles, 2014).

Aquestes alteracions no afecten el normal funcionament de la proteïna o enzim.

- **Resistència fora del lloc d'acció:** La degradació dels herbicides a compostos no fitotòxics és la base de la selectivitat que presenten moltes matèries actives en cultius tolerants davant de les males herbes sensibles. Als processos de detoxificació metabòlica, entès com aquells processos biològics als que les molècules fitotòxiques són metabolitzades a compostos innocus o menys tòxics, els biotips resistents són capaços de degradar l'herbicida abans de que aquest produeixi danys irreversibles.

Els mecanismes de resistència fora del lloc d'acció que fins ara s'han descrit en plantes són (Prado, 2011):

- **Seqüestració:** Increment en la capacitat de segrestar l'herbicida o els metabòlits potencialment fitotòxics dins de la vacuola o altres compartiments cel·lulars.

- **Reparació dels efectes fitotòxics:** Consisteix en recobrar el potencial de membrana un cop que s'ha retirat l'herbicida causant de la despolarització, ja que alguns herbicides despolaritzen el potencial de la membrana plasmàtica en cèl·lules parenquimàtiques d'algunes espècies mitjançant el flux específic de protons que aquest compost produeix cap a l'interior de la cèl·lula.

- **Metabolització en molècules no tòxiques:** Els herbicides són degradats a compostos innocus o menys tòxics per part dels biotips resistents abans que aquests causin danys irreversibles en la planta. És el mecanisme de resistència a herbicides fora del lloc d'acció més comú en les males herbes (Yu & Powles, 2014).

- **Reducció de la concentració d'herbicida en el lloc d'acció:** La intenció és que arribi una concentració d'herbicida a la diana que no sigui suficient per desencadenar el procés fitotòxic i per matar a la planta. La reducció de la penetració o absorció i de la translocació són els principals mecanismes de resistència d'aquest tipus que podem trobar en algunes males herbes.

La millor manera de prevenir l'evolució de males herbes resistents als herbicides és la implementació de sistemes de cultius diversificats, és a dir, amb rotació de cultius, sobretot d'hivern amb primavera/estiu, que a més permetin l'ús d'herbicides menys freqüents i amb MOA diferents, i que s'incorporin també pràctiques de maneig no químiques per reduir la pressió de selecció (Beckie et al., 2006).

1.3. *Papaver rhoeas*

1.3.1. Característiques biològiques de l'espècie

La rosella (*Papaver rhoeas* L.) és una mala herba anual, que està present a tot els continents, però és més abundant a Europa, lloc on es va originar (Holm et al., 1997). La rosella és una de les males herbes de fulla ampla més importants en quan a la infestació dels cereals a tota Europa; sobretot a les zones del sud amb un clima mediterrani (Kaloumenos, 2014). De fet, és la dicotiledònia més comuna i problemàtica en els cereals d'hivern al sud d'Europa (Cirujeda et al., 2006).

Al nord-est d'Espanya, la rosella, junt amb altres males herbes com el *Lolium rigidum* Gaudin, *Avena sterilis* L. i *Bromus diandrus* Roth, són les principals espècies problemàtiques dels cereals d'hivern (Cirujeda, 2001). Aquesta espècie, generalment associada als cultius de cereals, prefereix sòls calcaris i no creix en sòls argilosos i de turba (McNaughton & Harper, 1964).

La rosella és una mala herba diploide ($2n = 14$), hermafrodita i amb pol·linització totalment creuada (Délye et al., 2011). La pol·linització creuada contribueix als alts nivells de variació genètica i a la heterozigositat (Aguinagalde et al., 2005). És una espècie competitiva, i en funció de la seva densitat provoca reduccions significatives del rendiment del cultiu fins un 32% (Torra & Recasens, 2008). La capacitat d'aquesta espècie per envair, créixer i romandre als camps de cultius es pot atribuir a un banc de llavors persistent (les llavors d'aquesta espècie poden sobreviure fins a 8 anys després de ser produïdes), un extens període de germinació que va des de principis de tardor a principis de la primavera (Cirujeda et al., 2008), i una alta producció de llavors (fins 40.000 llavors per planta amb competència amb el cereal) (Torra & Recasens, 2008).

Al nord d'Espanya, la rosella és una mala herba que té competència amb els cereals d'hivern i és difícil de controlar, especialment degut a la resistència als herbicides. El número de poblacions resistents als herbicides 2,4-D i/o sulfonilurees al nord d'Espanya està augmentant constantment des de l'aparició d'aquest fenomen a finals del 1990 (Cirujeda, 2001). L'aparició d'aquestes poblacions resistents al nord d'Espanya als cereals d'hivern es relaciona amb la reducció dels mètodes culturals, una major dependència dels herbicides i la implementació del sistema de monocultiu (Taberner, 2001).

A Europa, s'han descrit biotips de rosella resistents a herbicides de diferents famílies químiques. Concretament a dues: a les sulfonilurees (tribenuron-metil),

inhibidors de l'enzim acetolactat sintasa (ALS) (grup B) i al 2,4-D, una auxina sintètica (grup O) (Cirujeda et al., 2008). Els biotips resistents als herbicides (a sulfonilurees i auxines sintètiques) de rosella s'estenen a través d'Europa, és a dir, Espanya (Duran-Prado et al., 2004; Cirujeda, 2001), Itàlia (Scarabel et al., 2004), Grècia (Kaloumenos et al., 2009), Dinamarca i Regne Unit (Heap, 2019), amenaçant la rendibilitat dels sistemes de producció dels cereals. A Espanya, s'han confirmat casos de rosella resistent a les províncies de Navarra (Tiebas et al., 2001), Barcelona, Lleida, Osca, Saragossa, La Rioja i Burgos (Taberner, 2001). A més, s'estima que en l'actualitat el 40% dels camps infestats amb rosella tenen poblacions resistents, al voltant d'un 20% resistents a tribenuron-metil, un 5% a 2,4-D i un 15% amb poblacions amb resistència múltiple (Rey-Caballero et al., 2016b).

1.3.2. La rosella en els cereals d'hivern

Els problemes amb la rosella a Espanya es troben principalment a les àrees de secà de cereals del nord d'Espanya. És precisament en aquesta zona on menys rotacions amb cultius de primavera o estiu es practiquen (CPRH, 2015). Des de fa dècades el mínim o inexistent conreu de la terra és la pràctica de conreu més habitual (Cirujeda, 2001). A més, en totes aquestes zones cerealistes, el control es basa en gran mesura en els herbicides. Amb freqüència, es fa un sol tractament en post-emergència per controlar les males herbes de fulla ampla entre desembre i març. Una segona aplicació amb els mateixos o diferents herbicides és menys freqüent, i es practica amb la finalitat de controlar les males herbes que han sobreviscut o les que han germinat noves. Per un altre costat, les rotacions d'herbicides amb diferents modes d'acció d'un any a un altre és poc freqüent (Cirujeda, 2001). En aquest escenari, el desenvolupament d'un Programa de Maneig Integrat de males herbes (IWM) és obligatori degut a que s'han seleccionat biotips resistents de rosella com a resultat de l'ús excessiu de poques molècules i la reducció de les tècniques de gestió cultural a les últimes dècades.

1.3.3. Resistència a herbicides en la rosella

Com a conseqüència de la sistemàtica aplicació d'herbicides per al seu control (2,4-D i sulfonilurees), s'han seleccionat biotips resistents. El 1992 es van detectar els primers problemes de control de rosella amb 2,4-D, una auxina sintètica (Taberner et

al., 1992), i el 1998 la presència de biotips amb resistència múltiple a 2,4-D i tribenuron-metil, inhibidor de la ALS (Claude et al., 1998). Aquest fet dificulta encara més el control químic d'aquestes poblacions. Recentment, al nord d'Espanya, s'han detectat alguns problemes en el control de rosella amb barreges que contenen bromoxinil.

1.3.3.1. Resistència a 2,4 D

El 2,4-D o àcid diclorofenoxiacètic (és un herbicida auxínic del grup O segons HRAC) va ser el primer herbicida sintètic en ser comercialment desenvolupat (Song, 2014). La introducció d'aquest herbicida a l'agricultura espanyola va començar als anys 50 degut a la seva alta eficàcia, i la falta d'alternatives de productes com el 2,4-D per les males herbes de fulla ampla (Cirujeda, 2001). El control deficient de la rosella a Espanya amb el 2,4-D es va informar per primera vegada el 1992 (Taberner et al., 1992). Tot i el seu ampli ús, el mode precís d'acció i conseqüentment, el mecanisme de resistència a herbicides auxínics, no s'entenen completament (Mithila et al., 2011).

1.3.3.2. Resistència a tribenuron-metil

La sulfonilurea tribenuron-metil és un inhibidor de l'ALS (grup B d'acord a la HRAC). L'ALS és un enzim clau per la planta responsable de la biosíntesis dels aminoàcids essencials de cadena ramificada valina, leucina i isoleucina (Duggleby et al., 2008). En conseqüència, les plantes afectades moren per aquest herbicida degut a la falta d'aminoàcids de cadena ramificada. El tribenuron-metil s'ha venut a Espanya des del 1986 (Cirujeda, 2001), i al 1998 es va citar el primer cas de resistència d'un biotip de rosella tant a 2,4-D com a tribenuron-metil (Claude et al., 1998). A Espanya, la resistència a tribenuron-metil és deguda sobretot a una substitució aminoàcida de l'ALS en la posició 197 (mecanisme lligat al lloc d'acció) (Durán-Prado et al., 2004), tot i que també pot ocórrer la presència de metabolisme, com a mecanisme fora del lloc d'acció (Rey-Caballero et al., 2017a). La mutació fa que l'augment de la dosi de tribenuron-metil no tingui cap efecte en plantes de rosella resistents a aquest. S'ha d'afegir que, en aquestes poblacions, els dos mecanismes, tant lligat com fora del lloc d'acció, confereixen un cert grau de resistència creuada a altres inhibidors de la ALS (Rey-Caballero et al., 2017a).

1.3.3.3. Problemes amb bromoxinil

El bromoxinil (3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo) és un herbicida que pertany al grup C3 (nitrils), i inhibeix el fotosistema II (Hess, 2000). És un herbicida selectiu, de contacte i amb alguna activitat sistèmica que quan s'absorbeix per les fulles experimenta una limitada translocació. Actua impedit la segona reacció lumínica de la fotosíntesis i també separa la fosforilació oxidativa de la respiració, alterant les funcions de la membrana.

Recentment, la manca de control de la rosella s'ha descrit en alguns camps d'Espanya on es van aplicar barreges de post-emergència que contenen bromoxinil (Kaloumenos, 2014). Les recomanacions sobre l'ús de les dosis d'herbicides es basen en les etapes de creixement de les males herbes, trobades en el moment de l'aplicació. No obstant això, és molt poc probable trobar etapes fenològiques uniformes dins de les poblacions de males herbes, especialment en espècies com la rosella que tenen un període de germinació prolongat (Cirujeda et al., 2008). Aquesta font de variabilitat produeix una variació en la quantitat d'elements actius que arriba per unitat de pes o àrea foliar de les plantes diana. Això pot produir un "efecte diluent" de l'herbicida en les males herbes germinades primer (plantes més grans), promovent condicions subletals (Vila-Aiub & Ghersa, 2005). En general, les dosis baixes d'herbicides (dosis subletals) tenen el potencial d'accelerar l'evolució de la resistència i provocar una major resistència creuada per la resistència metabòlica (Neve et al, 2014). Estudis recents, fets en diferents espècies, han demostrat que l'eficàcia del bromoxinil depèn de la fase fenològica (Corbett et al., 2004; Forcella et al., 2015). En el cas de la rosella, no sé sap fins a quin punt la mida de la planta pot afectar l'eficàcia del bromoxinil. Per tant, per estudiar una possible resistència al bromoxinil en rosella, és important saber si de fet, les queixes de manca de control són derivades de la presència de plantes massa grans en el moment del tractament, com per exemple, fruit d'una aplicació tardana.

Els principals tractaments herbicides per controlar la rosella amb post-emergència són, de sortida, reduïts:

- grup O, auxines sintètiques: 2,4 D, MCPA, dicamba o aminopiraldid
- grup B, inhibidors de la ALS: tribenuron-metil, i sulfonilurees en general, florasulam, imazamox
- Bromoxinil (grup C3, inhibidor del fotosistema II)
- Carfentrazona (grup E, inhibidor de la PPO)

Com s'ha esmentat, les poblacions de rosella amb resistència múltiple al grup O i grup B són habituals. Per tant, les opcions de control químic en post-emergència és veuen encara més reduïdes, només en quedarien dos, i en dificulten molt el seu maneig adequat. Per tant, estudiar l'evolució de la possible resistència als pocs modes d'acció que queden per controlar les poblacions de rosella resistents en post-emergència esdevé molt important, com per exemple, al bromoxinil o herbicides del grup C3.

Els estudis efectuats no permeten afirmar que la falta de control de rosella a camp amb bromoxinil sigui conseqüència de l'aparició d'una resistència. Actualment, s'estan fent estudis per determinar si la rosella presenta resistència al bromoxinil o és un efecte produït per aplicacions en estats fenològics avançats.

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball d'investigació és estudiar la possible resistència múltiple a l'herbicide bromoxinil que es pot trobar en un biotip de rosella (*Papaver rhoeas*). Més concretament, es pretén aportar dades que permetin confirmar l'evolució de la resistència en rosella a l'herbicide bromoxinil i esbrinar la potencial funció de l'enzim citocrom P450 en la resistència a aquest herbicide. S'estudiaran dos poblacions (original i descendents) potencialment resistents al bromoxinil i dos poblacions que en són susceptibles.

A més, s'estudiarà si econòmicament és rentable l'aplicació d'aquest tipus d'estratègia per combatre la mala herba dicotiledònia més comuna en els cereals d'hivern al sud d'Europa.

Els objectius específics d'aquest treball són:

- Determinar la possible resistència d'una població al bromoxinil i la heretabilitat d'aquest factor entre generacions d'aquesta.
- Estudiar quin efecte té l'estat fenològic (òptim i lleugerament més avançat) de la mala herba en la eficàcia de l'herbicide.
- Esbrinar si l'enzim citocrom P450 és responsable de la degradació de l'herbicide aplicant el bromoxinil juntament amb insecticides inhibidors d'aquests.
- Valorar el cost econòmic que suposa l'execució d'aquesta estratègia a poblacions que presenten fenologies diferents i resistència a determinats herbicides.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Material vegetal

La població potencialment resistent B-013, que es va obtenir de plantes que havien sobreviscut a les aplicacions de l'herbicida bromoxinil d'un camp situat a Tosantos, Burgos (42°24'43.7"N 3°14'39.9"W) l'any 2013, està caracteritzada per presentar uns nivells baixos de tolerància a l'herbicida bromoxinil (família química dels nitrils, grup C3, inhibidors del fotosistema II) segons Torra & Rey-Caballero (2017). A més, aquesta població es caracteritza com a resistent als herbicides inhibidors de l'enzim ALS (grup B) i a les auxines sintètiques (grup O) en estudis previs (Rey-Caballero et al., 2016a; 2017a). L'any 2016 es va efectuar, de forma controlada, la pol·linització creuada entre plantes d'aquesta població que havia sobreviscut a l'aplicació d'1 l/ha de bromoxinil, per obtenir una nova generació (fills), anomenada B-016, per veure l'herència de la potencial resistència, requisit per poder-la confirmar (HRAC, 2019). L'any 2017, seguint la mateixa metodologia feta l'any anterior, es va obtenir la segona generació de la població B-016, anomenada B-017, és a dir, els nets de la població B-013 original. La població B-016 no es va poder utilitzar per l'assaig ja que per causes que es desconeixen no va acabar germinant cap llavor. Per tant, en aquest treball es consideraran la població B-013 i els seus descendents de segona generació (B-017) com a dues poblacions diferents.

Pel que fa a les poblacions sensibles, la HS-S07 és una població estàndard sensible que es va obtenir d'un distribuïdor de llavors l'any 2007 (Herbiseed, Twyford, Regne Unit), i la població B-S113 es va obtenir de Burgos l'any 2013 dels marges d'un camp on mai s'havia aplicat cap herbicida. Aquestes poblacions s'han emprat en diversos estudis com a estàndards sensibles vàlids de l'espècie (Rey-Caballero et al., 2016a; 2016b; 2017a; Torra et al., 2017b).

Les llavors utilitzades per desenvolupar l'assaig han estat proporcionades pel grup de recerca en Malherbologia i Ecologia Vegetal del departament d'Hortofruticultura, Botànica i Jardineria de la Universitat de Lleida, els quals disposaven d'aquest material vegetal emmagatzemat al laboratori en condicions adequades.

3.2. Mètodes de propagació

Per iniciar la propagació de les diferents poblacions necessàries per fer l'assaig, es va pesar la quantitat de llavors necessària de cada una de les poblacions, entre 0.1 i 0.5 per població en funció de la disponibilitat (0.1 grams equivalen a 1000 llavors de rosella) (Torra & Recasens, 2008).

Les llavors pesades es van sembrar en safates d'alumini foradades per tal que pogués drenar l'aigua i omplertes amb 1 cm de torba comercial (Figura 2).

Per obtenir les condicions climàtiques òptimes per una bona germinació, les safates es van col·locar dins una càmera de creixement en un règim de temperatures de 17/7 °C dia/nit i a un fotoperíode de 16 hores sota un flux de llum de 350 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Figura 3). Es regaven periòdicament per mantenir la torba saturada d'aigua.



Figura 2: Mostra de dues safates d'alumini utilitzades per la germinació de les llavors de les quatre poblacions de *Papaver rhoeas*.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.



Figura 3: Càmera de germinació utilitzada per la germinació de les quatre poblacions de *Papaver rhoeas*.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament.

Després de 14 dies d'haver sembrat les llavors, el percentatge de germinació de les diferents poblacions havia sigut molt irregular. Davant aquest fet, a les safates de les poblacions que no havien germinat, es va aplicar àcid giberèlic al 0,02% per millorar-ne la germinació. La resta de poblacions que ja havien germinat, es van deixar dins la càmera de creixement a una temperatura més baixa de 6°C i constant per tal de retardar-ne el seu creixement. Després de 19 dies d'haver sembrat les llavors, es van tornar a sembrar les de les poblacions B-016 i B-017 degut a que no havien germinat suficients plantes com per poder desenvolupar l'assaig, i es va afegir nitrat

potàssic (KNO₃) al 0,2% ja que està considerat com un estimulador de la germinació de les llavors.

El fet de que hi hagués plantes que haguessin germinat després de 14 dies d'haver-ne sembrat les llavors i d'altres que haguessin germinat més tard, va permetre establir dues fenologies de plantes, 1^a i 2^a fenologia.

Després d'un mes de sembrar les llavors per primera vegada, es van trasplantar les plantes classificades com a 2^o fenologia en testos de plàstic de 7x7x7cm. El substrat estava format d'una barreja de sorra 40% (w/v), torba 60% (w/v) i perlita per tal que sigues un substrat ben airejat. Es van trasplantar cinc plàntules per test, per assegurar un mínim de tres plantes en cada un d'ells en el moment de dur a terme les aplicacions (Figura 4). Seguint la mateixa metodologia, després de 34 dies de l'inici de l'assaig, es van trasplantar les plantes classificades com a 1^a fenologia.

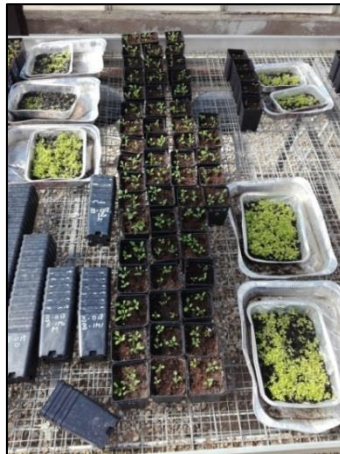


Figura 4: Transplantament de les plàntules germinades, de les safates als testos.
Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.

Els testos es van ubicar en un hivernacle de la Universitat de Lleida (l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària i Alimentària). Depenent de les necessitats hídriques de les plàntules, s'anaven efectuant els diferents regs. També, segons necessitats, es van fertilitzar els testos amb un adob concentrat.

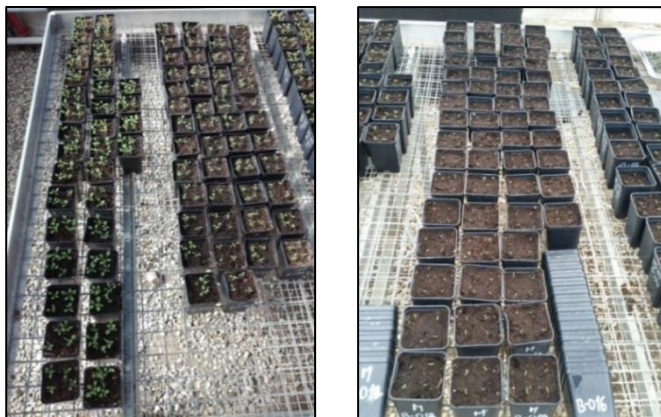


Figura 5: Testos on hi ha les plàntules trasplantades ja ubicats a l'hivernacle. La foto de l'esquerra és del moment del transplantament de les plàntules de segona fenologia. I, la de la dreta, de les plàntules de primera fenologia.
Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.

3.3. Experiment dosis-resposta

L'estat fenològic en que es trobaven les plantes de cada una de les poblacions en el moment de l'aplicació va ser 14-16 BBCH per la primera fenologia i 16-18 BBCH per la 2^a fenologia (Hess et al., 1997) (Figura 6). L'experiment constava de dues parts: 1^a fenologia, on les plantes es van tractar només amb bromoxinil; i 2^a fenologia, on a més, la meitat dels tests es van tractar prèviament amb un insecticida inhibidor del citocrom P450 abans d'aplicar el bromoxinil. En aquest darrer cas, els tests van ser tractats primerament amb l'insecticida malatió (Dietil 2-[(dimetoxifosforotioil)sulfanil] butanedioat), a una dosi de 2000 g i.a./ha (Torra et al., 2017a), i al cap d'una hora i mitja, es va aplicar l'herbicida bromoxinil. L'ús d'aquests inhibidors del citocrom P450 és molt comú en aquest tipus d'experiments per esbrinar els mecanismes de resistència en males herbes (Yu & Powles, 2014), i també de la rosella en particular (Torra et al., 2017a).



Figura 6: Foto de les plàntules en el moment del tractament. El test de l'esquerra mostra les plàntules en un estat fenològic 14-16 BBCH (1^a fenologia) i el test de la dreta mostra les plàntules en un estat fenològic 16-18 BBCH (2^a fenologia).
Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.

Les plantes que es trobaven en 1^a fenologia van ser tractades el dia 16/03/2018, i les plantes que es trobaven en 2^a fenologia van ser tractades el dia 20/03/2018.

El disseny experimental d'aquestes dues parts de l'assaig va ser de set tesis (dosis d'herbicides) diferents formades per quatre repeticions (cada repetició estava formada per un test de tres plàntules) per a cada població i grup. Les dosis aplicades de l'herbicida bromoxinil van ser: testimoni (0 g i.a./ha), 1/16x (24,75 g i.a./ha), 1/8x (49,50 g i.a./ha), 1/4x (99 g i.a./ha), 1/2x (198 g i.a./ha), 1x (196 g i.a./ha) i 2x (792g i.a./ha).

Les plantes sense aplicació de bromoxinil o només amb aplicació prèvia de malatió es van utilitzar com a plantes control per observar la resposta d'aquestes davant dels tractaments i per comprovar que el malatió no afecta de forma significativa el creixement normal de les plantes. Després de 28 dies d'haver aplicat els productes es va procedir a fer el mostreig de les plàntules per observar-ne les diferents respostes.

3.4. Dades

Primer, es va fer l'avaluació de la proporció de supervivència per test.

A continuació, es va separar la part aèria de les plantes per tal de poder-ne mesurar el pes fresc amb l'ajuda d'una balança de precisió. Finalment, per poder mesurar-ne el pes sec, es van ficar les mostres obtingudes de les plantes a l'estufa a una temperatura de 70°C durant 48 hores.

Amb les dades obtingudes i mitjançant la següent fórmula, es va calcular el percentatge de reducció del pes fresc i pes sec de les plantes respecte al testimoni no tractat:

$$\% \text{ reducció de pes} = \frac{\text{mitjana de pes fresc a dosis } X}{\text{mitjana de pes fresc a dosis } 0} \cdot 100$$

On X representa la dosi per la qual calculem el percentatge de reducció.

3.5. Anàlisi estadística

Les dades de dosi-resposta obtingudes en l'assaig, es van analitzar utilitzant un model de regressió no lineal de tipus sigmoïdal, mitjançant una corba de tipus logística de quatre paràmetres que permet estimar la S50, la PF50 o la PS50.

La S50 és la dosi d'herbicida necessària perquè es redueixi la supervivència de les plantes un 50% respecte al testimoni no tractat, la PF50 és la dosi necessària perquè es redueixi el pes fresc de les plantes un 50% i la PS50 és la dosi necessària perquè es redueixi el pes sec de les plantes un 50%. La fórmula utilitzada era del tipus:

$$y = c + \frac{(d - c)}{1 + \exp [b (\log(x) - \log(PF50, PS50 \text{ o } S50))]}$$

on la "c" és el límit inferior, la "d" és el límit superior i la "b" és la pendent de la corba al voltant del punt d'inflexió, PF50 per a la reducció de pes fresc, PS50 per a la reducció de pes sec i S50 per a la supervivència. En aquesta equació de regressió no lineal, la dosi d'herbicida era la variable independent (x) i les variables resposta (y) eren la supervivència, el pes fresc o el pes sec de les plantes expressat com el percentatge de reducció respecte al control no tractat.

Per tal de poder fer els ajustos no lineals de les gràfiques de pes fresc o pes sec, els valors de creixement positiu, és a dir, els valors negatius a la gràfica, els quals són deguts a un fenomen d'hormesis, se'ls va assignar el valor 0.

Amb els valors obtinguts dels ajustos no lineals, es va calcular l'índex de resistència (IR) per a cada població, tant per la supervivència, com pel pes fresc o pes sec. De cada una de les poblacions, es va fer el càlcul considerant la S50 de la supervivència un 50%, la PF50 la reducció del pes fresc, i la PS50 la reducció del pes sec fent el quocient respecte a la S50, PF50 o PS50 de la població estàndard sensible B-S113. Valors de IR al voltant d'1 vol dir que les poblacions són sensibles. Valors superiors a 1 indiquen quanta més dosi d'herbicida cal aplicar per obtenir el mateix efecte que en la població sensible. Així un IR de 10 per la S50 vol dir que cal 10 vegades més dosi d'herbicida per matar el 50% de les plantes igual que en la població sensible. Es parla de resistència per valors superiors a 4 (HRAC, 2019).

Finalment, una vegada es van estudiar tots els resultats obtinguts, es va considerar que les dades del pes sec no s'utilitzarien pel document principal del present treball, ja que els resultats obtinguts de l'estudi estadístic mostraven alguna desviació respecte les dades obtingudes del pes fresc. Tot i així, les dades de l'avaluació i els resultats de l'estudi estadístic es poden trobar a l'apartat d'annexos del treball.

4. RESULTATS

Pel que fa referència a l'avaluació de supervivència, a la Taula 2 es pot observar que la població sensible B-S113 i les poblacions potencialment resistents B-013 i B-017 presenten uns valors similars del paràmetre S50. Un aspecte a ressaltar, és que la població sensible HS-S07 presenta uns valors superiors a la resta de poblacions sensibles i les potencialment resistents, el que ens indica que per obtenir un 50% de mortalitat de la població es necessita una major dosi d'herbicida respecte la que es necessita per la resta de poblacions.

Pel que fa a les poblacions potencialment resistents (B-013 i B-017), s'observa que els valors del paràmetre S50 entre poblacions són molt similars. La població B-017 (descendents), en plantes de primera fenologia tractades amb bromoxinil, necessita una dosi superior de producte per obtenir un 50% de la mortalitat de la població respecte la població B-013 (original), succeint tot el contrari en plantes de segona fenologia, on les plantes de la població B-013 (original) necessiten una dosi superior de producte per obtenir un 50% de la mortalitat de la població.

Els valors del paràmetre S50 de les plantes de segona fenologia respecte les de primera fenologia són més grans per cada una de les poblacions (tant en les poblacions sensibles com en les potencialment resistents), el que ens indica que per tenir un 50% de mortalitat de la població de les plantes de segona fenologia es necessita més dosi d'herbicida respecte la que es necessita per les plantes de primera fenologia (Taula 2). En la població B-017 no es compleix aquest fet, ja que en les plantes de segona fenologia tractades amb bromoxinil es necessita una dosi de producte inferior a les de primera fenologia.

En les plantes de segona fenologia, als resultats obtinguts entre les aplicacions de bromoxinil i bromoxinil amb una aplicació prèvia de malatió, es pot observar que en la població sensible HS-S07, i les poblacions tolerants B-013 i B-017 es necessita una dosi superior de producte per obtenir el 50% de la mortalitat de la població quan s'ha fet una aplicació prèvia de malatió, la qual cosa demostra que les aplicacions prèvies de malatió no canvien el fenotip de la planta fent que reverteixi de resistent a sensible

(Taula 2). A diferència d'aquestes tres poblacions, la població sensible B-S113 necessita una dosi superior de producte quan només es dur a terme una aplicació de bromoxinil.

Pel que fa a l'índex de resistència (IR), els valors obtinguts entre poblacions són molt similars entre elles, amb un patró igual que per al paràmetre S50. La població sensible HS-S07 mostra un IR superior a la població sensible B-S113 i les poblacions tolerants B-013 i B-017. Les diferents generacions de les poblacions tolerants (B-013 (original) i B-017 (descendents)), presenten uns IR similars entre elles, sense observar-se una tendència a augmentar els IR entre generacions. El fenotip de les diferents poblacions estudiades, mostren que les plantes amb un estat fenològic més avançat (segona fenologia) es van comportar de forma més tolerant a l'herbicida presentant un IR més elevat. Les plantes de segona fenologia amb una aplicació o sense aplicació prèvia de malatió, tot i presentar resultats similars, també mostren una tendència a presentar un IR més elevat a les plantes tractades amb una aplicació prèvia de malatió. Tot i així, els resultats ens indiquen que cap de les poblacions estudiades (ni les sensibles ni les potencialment resistents) presenten resistència a l'herbicida, i s'han comportat totes les poblacions com a sensibles a l'herbicida.

A la Taula 2 també es pot observar que els ajustos van ser estadísticament significatius i satisfactoris en tots els casos ($P < 0.05$). És per això que el paràmetre R^2 va estar molt proper a 1 en tots els ajustos no lineals, indicant la seva bondat.

Taula 2: Paràmetres de les corbes sigmoïdals de les dades de supervivència (%) de dues poblacions sensibles (HS-S07 i B-S113) i dues poblacions potencialment resistents a bromoxinil (B-013 i B-017) de rosella. Es mostren els resultats de dues fenologies (primera, 1era; segona, 2ona), i per la 2ona, també amb l'aplicació prèvia de malatió IR: índex de resistència.

POBLACIÓ	FENOLOGIA	TRACTAMENT	S50	ERROR ESTÀNDARD	PENDENT	MÀXIM	MÍNIM	P	R ² AJUSTADA	IR
HS-S07	1era	bromoxinil	335,349	6,195	-3,202	100,495	-6,350	<0,000	0,999	1,862
	2ona	bromoxinil	442,046	5,351	-2,966	100,376	-0,014	0,000	0,999	1,924
	2ona	Bromoxinil + malatió	522,078	16,805	-2,475	100,510	-0,645	0,003	0,999	2,272
B-S113	1era	bromoxinil	180,045	0,112	-11,560	99,999	-0,005	<0,000	1,000	1,000
	2ona	bromoxinil	229,741	35,272	-5,699	94,905	-1,997	0,024	0,959	1,000
	2ona	Bromoxinil + malatió	215,574	8,980	-3,929	101,400	0,796	0,002	0,995	0,938
B-013	1era	bromoxinil	169,349	63,717	-11,463	100,051	2,774	<0,000	0,995	0,941
	2ona	bromoxinil	280,356	38,508	-1,763	102,158	-1,933	0,000	0,979	1,220
	2ona	Bromoxinil + malatió	317,865	7,372	-3,257	100,605	1,495	<0,000	0,9987	1,384
B-017	1era	bromoxinil	196,299	6,348	-4,793	101,127	2,278	0,003	0,995	1,090
	2ona	bromoxinil	141,892	19,410	-2,085	103,646	-3,41E-14	0,018	0,968	0,618
	2ona	Bromoxinil + malatió	284,796	35,786	-2,015	99,737	-5,645	0,001	0,982	1,240

En referència al percentatge de reducció del pes fresc, els resultats de la Taula 3 mostren que els valors obtinguts són similars als de l'avaluació de supervivència.

Pel que fa al paràmetre de la PF50, es pot observar que la dosi necessària per reduir un 50% el pes fresc de les plantes és similar entre poblacions (sensibles i potencialment resistents), tot i que cal destacar, que igual que en l'avaluació de supervivència, la població sensible HS-S07 necessita una dosi de producte més elevada per obtenir els mateixos resultats que la resta de poblacions.

Entre les poblacions potencialment resistents (B-013 (original) i B-017 (descendents)), tot i observar-se uns valors similars del paràmetre PF50 entre les diferents generacions, es pot veure que la població B-013 es mostra més sensible en plantes de primera fenologia i més tolerant en plantes de segona fenologia respecte la població B-017.

A la Taula 3 també es pot observar que la dosi necessària de producte per reduir un 50% el pes fresc és menor en plantes de primera fenologia que en plantes de segona fenologia, exceptuant algun cas en concret com són la població sensible B-S113 i la població tolerant B-017 amb l'aplicació de bromoxinil en segona fenologia, que mostra que és necessària més dosi d'herbicida per obtenir el mateix percentatge de reducció de pes fresc que en plantes de primera fenologia.

En les plantes de segona fenologia s'observa que a les poblacions HS-S07, B-S113 i B-017 es necessita una dosi superior de producte per reduir el 50% el pes fresc de la població quan s'efectua una aplicació prèvia de malatió. A diferència d'aquestes, la població B-013 necessita una dosi més elevada de producte quan només s'ha fet una aplicació de bromoxinil.

Pel que fa a l'IR, els resultats mostren que les poblacions presenten un fenotip de poblacions sensibles en tots els casos, tot i observar-se en algun cas un IR superior a 3 (la població B-013 en plantes de 2^a fenologia amb bromoxinil) o 4 (la població HS-S07 en plantes de 2^a fenologia amb bromoxinil + malatió). De les dues poblacions sensibles estudiades, es pot observar que la població HS-S07 presenta valors de l'IR entre 1,5 i 4,2, el que ens indica que és una població menys sensible en comparació a la població B-S113 que presenta valors entre 1 i 2. Pel que fa a les poblacions tolerants, s'observa que les dues poblacions s'han comportat com a sensible, sense trobar-se diferències en l'IR entre generacions (la població B-013 (original) i la B-017 (descendents)). Els IR obtinguts de l'assaig, també mostren que el fenotip de les diferents poblacions estudiades, en primera o segona fenologia, són similars entre ells, tot i destacar que les plantes de segona fenologia presenten un IR més elevat respecte

les plantes de primera fenologia en totes les poblacions. Les plantes de segona fenologia amb aplicació o sense aplicació prèvia de malatió, també es van comportar de forma similar entre elles, tot i mostrar una tendència a tenir un IR més elevat en plantes on s'ha efectuat una aplicació prèvia de malatió.

Els valors del paràmetre P i del paràmetre R^2 estan per sota de 0,05 i per sobre de 0,9, respectivament, en la majoria dels casos, exceptuant les poblacions sensibles amb aplicacions de bromoxinil en segona fenologia, que presenten valors superiors en el cas del nivell de significació i inferior en la bondat de l'ajust. Tot i així, els ajustos de totes les poblacions es van considerar acceptables i satisfactoris.

Taula 3: Paràmetres de les corbes sigmoïdals de les dades de reducció del pes fresc (%) de dues poblacions sensibles (HS-S07 i B-S113) i dues poblacions potencialment resistents a bromoxinil (B-013 i B-017) de rosella. Es mostren els resultats de dues fenologies (primera, 1era; segona, 2ona), i per la 2ona, també amb l'aplicació prèvia de malatió IR: índex de resistència.

POBLACIÓ	FENOLOGIA	TRACTAMENT	PF50	ERROR ESTÀNDAR	PENDENT	MÀXIM	MÍNIM	P	R^2 AJUSTADA	IR
HS-S07	1era	bromoxinil	237,505	7,993	2,889	113,406	-0,386	0,000	0,999	1,568
	2ona	bromoxinil	354,028	190,833	1,372	99,629	0,000	0,115	0,803	2,744
	2ona	Bromoxinil + malatió	537,923	114,464	1,169	102,577	0,000	0,007	0,988	4,169
B-S113	1era	bromoxinil	151,454	0,5862	4,755	100,033	-0,160	<0,000	1,000	1,000
	2ona	bromoxinil	129,028	23,492	2,538	99,641	0,000	0,1498	0,944	1,000
	2ona	Bromoxinil + malatió	233,162	28,787	2,772	101,296	-2,611	0,0128	0,978	1,807
B-013	1era	bromoxinil	130,082	0,2628	6,426	98,899	-0,065	<0,000	1,000	0,859
	2ona	bromoxinil	432,192	178,070	1,341	117,899	-0,964	0,000	0,942	3,350
	2ona	Bromoxinil + malatió	318,686	80,378	1,069	108,283	0,000	<0,000	0,974	2,470
B-017	1era	bromoxinil	185,559	5,283	7,672	98,5952	-0,260	0,000	0,999	1,225
	2ona	bromoxinil	177,495	55,048	1,649	104,842	0,000	0,029	0,950	1,376
	2ona	Bromoxinil + malatió	267,066	131,937	1,648	107,930	0,000	0,062	0,894	2,070

A la Figura 7 es poden observar els gràfics de les corbes dosis-resposta de les dues poblacions sensibles estudiades (HS-S07 i B-S113), pel percentatge de supervivència o el percentatge de reducció del pes fresc.

Per la supervivència de la població sensible HS-S07, es pot observar que fins a una dosis de 150g i.a/ha de bromoxinil es manté la supervivència del 100% de la població per cada un dels tres tractaments. A mesura que s'augmenta la dosis d'aplicació dels tractaments d'herbicida s'observa clarament com va disminuint el percentatge de supervivència de la població, tot i que cal destacar, que aquest fet es produeix de forma més notòria en les plantes de primera fenologia respecte les de segona fenologia. Les plantes de primera fenologia presenten un 100% de

supervivència fins a una dosi de 150 g i.a/ha, un 35% a una dosi de 400 g i.a/ha i un 100% de mortalitat a una dosi de 1000 g i.a/ha. En canvi, les plantes de segona fenologia, amb o sense malatió (els resultats són similars tot i que una aplicació prèvia de malatió fa que el percentatge de supervivència de la població sigui superior si es compara per una mateixa dosi de bromoxinil), mostren un 100% de supervivència fins a una dosi de 150 g i.a/ha, entre un 68% i 60% amb una dosi de 400 g i.a/ha respectivament, i entre un 25% i 20% amb una dosi de 1000 g i.a/ha respectivament.

En referència al pes fresc, els resultats obtinguts segueixen la mateixa tendència que el percentatge de supervivència, diferenciant-se la primera fenologia per presentar un percentatge de la reducció del pes fresc més gran respecte les plantes de la segona fenologia amb o sense malatió a una mateixa dosi de bromoxinil, sempre i quan la dosi sigui superior a 130 g i.a/ha. Entre les plantes de segona fenologia cal destacar que les plantes on s'ha fet una aplicació prèvia de malatió, presenten un percentatge de reducció del pes fresc més baix respecte les plantes que només s'han tractat amb bromoxinil.

De la segona població sensible estudiada, la B-S113, en el gràfic del percentatge de supervivència es pot observar que a unes dosis d'entre 99 i 198 g i.a/ha de bromoxinil es redueix dràsticament el percentatge de supervivència de la població en qualsevol dels tractaments. En aquesta població, les plantes de primera fenologia presenten un 100% de mortalitat a una dosi de 300 g i.a/ha de bromoxinil, al mateix temps que les plantes de segona fenologia tractades amb bromoxinil no presenten un 100% de mortalitat fins a una dosi de 450 g i.a/ha i les plantes de segona fenologia tractades amb bromoxinil i una aplicació prèvia de malatió a una dosi de 1000 g i.a/ha.

Pel que fa al percentatge de reducció del pes fresc, la població B-S113 presenta uns percentatges molt similars entre les plantes de 1^a fenologia i les plantes de 2^a fenologia amb una aplicació prèvia de malatió fins a una dosi de 90g i.a/ha. Per contra, les plantes de 2^a fenologia tractades només amb bromoxinil, presenten entre un 35% i un 40% més de reducció de pes respecte els altres tractaments per una dosi de 90 g i.a/ha. A mesura s'incrementa la dosi, les corbes de dosi-resposta dels tractaments de les plantes de 1^a i 2^a fenologia amb bromoxinil, presenten resultats més similars entre ells, tenint un major percentatge de reducció del pes fresc respecte el tractament de bromoxinil amb una aplicació prèvia de malatió.

En els gràfics del pes fresc de cada una de les poblacions sensibles, es poden observar valors negatius. En les dues poblacions sensibles, s'observa aquest fet en les

plantes de 1^a fenologia (desenvolupament de 4-6 fulles verdaderes) a una dosi de 1/16X (24,75 g i.a/ha) i 1/8X (49,50 g i.a/ha), i en plantes de 2^a fenologia (desenvolupament de 6-8 fulles verdaderes) a una dosi de 1/8X (49,50 g i.a/ha). A la població B-S113 també s'ha observat el mateix a una dosi de 1/4X (99 g i.a/ha) amb plantes de 2^a fenologia.

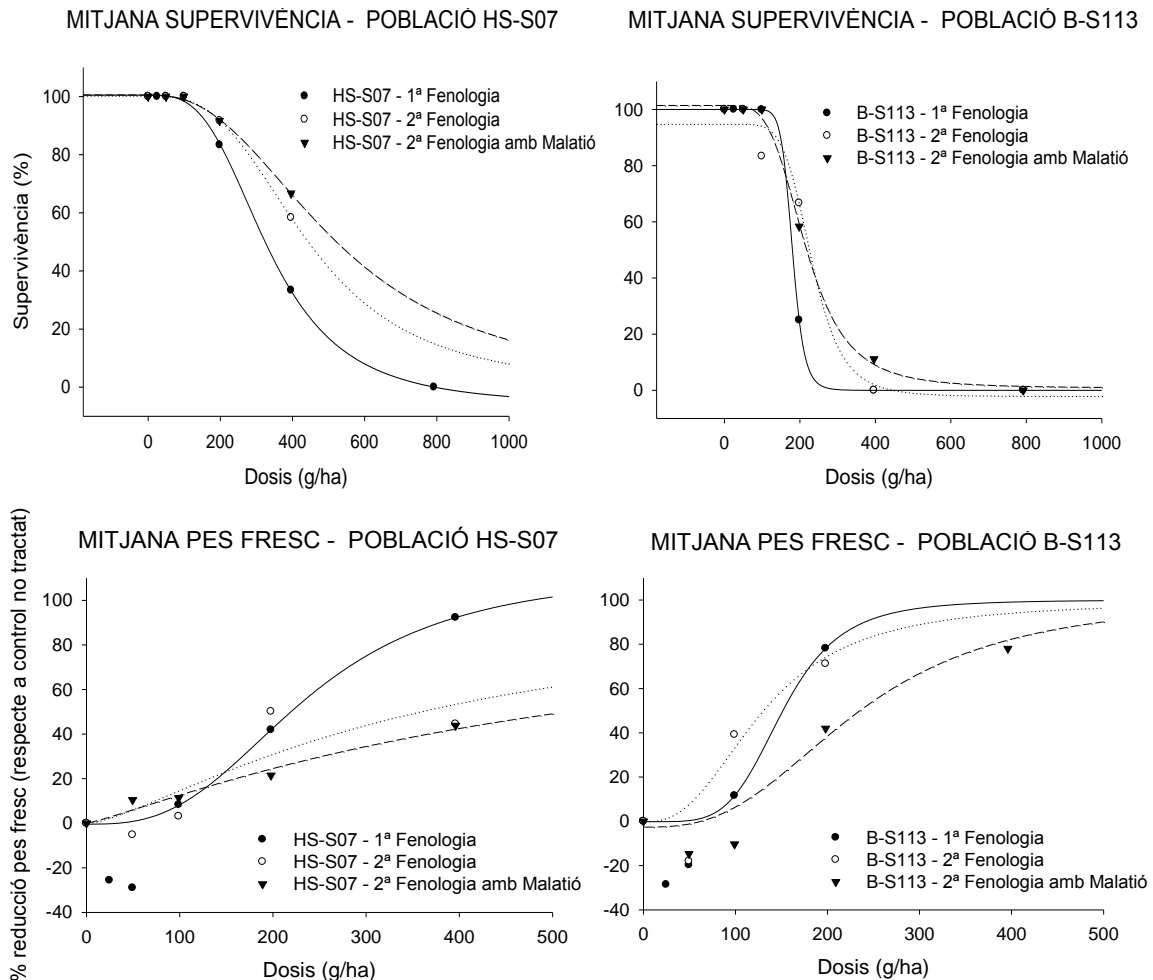


Figura 7: Gràfiques on es mostren els ajustos sigmoïdals per supervivència (gràfiques superiors) i per % de la reducció del pes fresc (gràfiques inferiors) de les poblacions sensibles HS-S07 i B-S113 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2^a fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatí en plantes de 2^a fenologia, triangles negres i línia discontinua.

A les Figures 8, 9 i 10 es pot observar de forma visual els resultats obtinguts en els experiments per les dues poblacions sensibles utilitzades, tant en primera com en segona fenologia (amb i sense malatí).

Les fotos de l'aplicació de l'herbicida bromoxinil en plantes de primera fenologia de les poblacions sensibles mostren que a una dosi més elevada de producte la planta presenta una mortalitat més elevada, i en conseqüència unes plantes menys desenvolupades i amb un pes fresc més baix (Figura 8).



Figura 8: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 1ª fenologia tractades amb bromoxinil de les poblacions sensibles HS-S07 i B-S113.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.

Dels resultats obtinguts de l'aplicació de l'herbicida bromoxinil en plantes de segona fenologia de les poblacions sensibles, a la Figura 9 s'observa una diferència important en el percentatge de supervivència entre la població HS-S07 i la població B-S113, presentant un major percentatge de supervivència les plantes de la població HS-S07 en cada una de les dosis d'aplicació del producte, a més de mostrar símptomes d'una important reducció del pes fresc en la majoria de plantes de les diferents dosis.



Figura 9: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2ª fenologia tractades amb bromoxinil de les poblacions sensibles HS-S07 i B-S113.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.

En les plantes de segona fenologia amb una aplicació prèvia de malatió, els resultats són similars a les plantes de segona fenologia sense l'aplicació prèvia de malatió, presentant un major percentatge de supervivència la població HS-S07 i un major pes fresc (Figura 10).



Figura 10: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2ª fenologia tractades amb bromoxinil + malatió de les poblacions sensibles HS-S07 i B-S113.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.

Els resultats obtinguts de l'assaig desenvolupat amb la població tolerant B-013, mostren que les plantes de primera fenologia tractades amb bromoxinil es van comportar com un fenotip sensible a l'herbicida, ja que a partir d'una dosi de 150 g i.a/ha el percentatge de supervivència disminueix de forma dràstica fins arribar a només un 8,3% de supervivència a una dosi de 396 g i.a/ha (Figura 11). Les plantes de segona fenologia, tot i no tenir un percentatge de mortalitat tant elevat a dosis baixes, tampoc es van comportar com una població resistent a l'herbicida. Les plantes tractades amb bromoxinil i una aplicació prèvia de malatió, tot i tenir una resposta similar a les plantes tractades amb bromoxinil, van tenir un major percentatge de supervivència a dosis baixes respecte les plantes tractades amb bromoxinil, ja que presenten una corba desplaçada més a la dreta. A mesura que es va anar augmentat la dosi, el percentatge de supervivència dels dos tractaments es va igualar, obtenint un 30% de supervivència a una dosi de 400 g i.a/ha. Finalment, a una dosi de 1000 g i.a/ha, les corbes es van revertir i les plantes tractades amb una aplicació prèvia de malatió van presentar un menor percentatge de supervivència.

En referència al pes fresc, els resultats van presentar una tendència semblant al gràfic de supervivència. Pel que fa al tractament de bromoxinil en plantes de primera fenologia, a una dosi de 200 g i.a/ha i va haver un percentatge de reducció del 90% i per una dosi de 400 g i.a/ha el percentatge de reducció va ser del 100%. Pel tractament de bromoxinil en plantes de segona fenologia, a una dosi de 200 g i.a/ha hi va haver un percentatge de reducció del 30%, per una dosi de 400 g i.a/ha el

percentatge de reducció va ser del 50%, i per una dosi de 800 g i.a/ha el percentatge de reducció és del 80%. Pel tractament de bromoxinil amb una aplicació prèvia de malatió en plantes de segona fenologia, a una dosi de 200 g i.a/ha i va haver un percentatge de reducció del 40%, a una dosi de 400 g i.a/ha el percentatge de reducció va ser del 60%, i per una dosi de 800 g i.a/ha el percentatge de reducció és del 78%.

Tal i com s'ha comentat en els gràfics del pes fresc de les poblacions sensibles (Figura 7), en la població B-013 també s'han obtingut valors negatius pel que fa al percentatge de reducció del pes fresc. A la població B-013 s'ha produït aquest fet a les plantes de 1^a fenologia (desenvolupament de 4-6 fulles verdaderes) i 2^a fenologia (desenvolupament de 6-8 fulles verdaderes) a una dosi de 1/16X (24,75 g i.a/ha) i 1/8X (49,50 g i.a/ha).

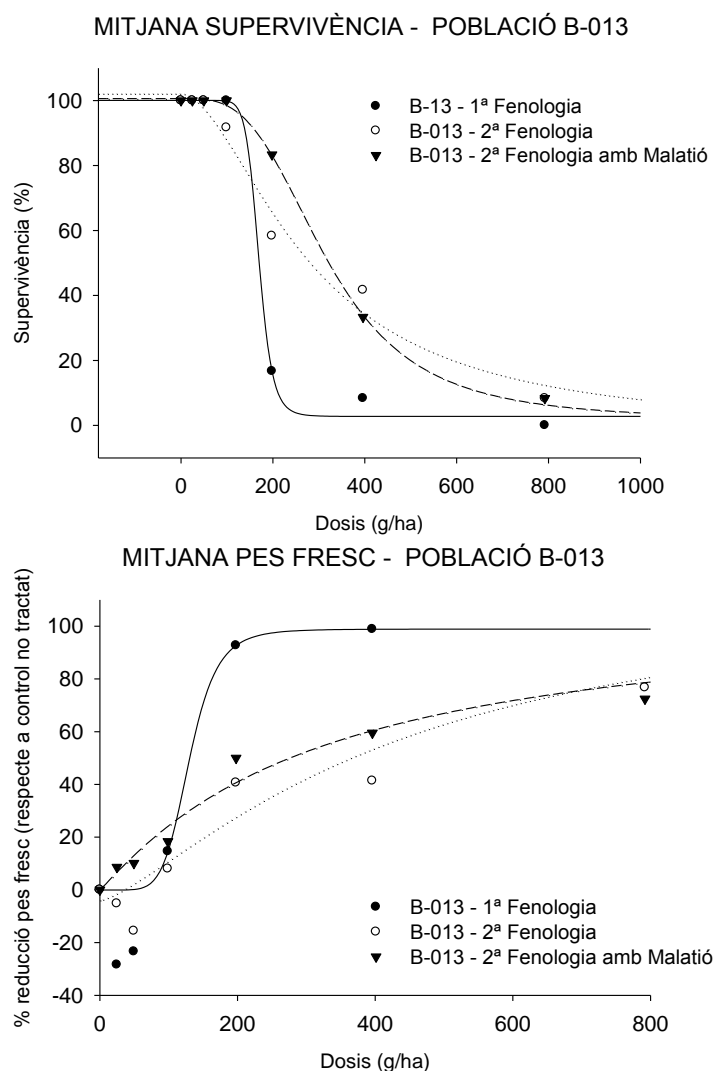


Figura 11: Gràfiques on es mostren els ajustos sigmoïdals per supervivència (gràfica superior) i per % de la reducció del pes fresc (gràfica inferior) de la població tolerant B-013 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1^a fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2^a fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatió en plantes de 2^a fenologia, triangles negres i línia discontinua.

L'aplicació de l'herbicida bromoxinil en plantes de primera fenologia de la població B-013 ha mostrat una alta efectivitat a unes dosis d'1/2X (200 g i.a/ha), 1X (400 g i.a/ha) i 2X (800 g i.a/ha), obtenint un 100% de mortalitat (Figura 12). En plantes de segona fenologia, tal i com es pot observar en les imatges, s'ha obtingut una menor efectivitat respecte les de primera fenologia, obtenint només un 100% de mortalitat només a una dosi de 2X (Figures 13 i 14). També cal remarcar que les plantes on s'ha fet un aplicació de bromoxinil a dosis molt baixes (1/8X) s'han desenvolupat més obtenint una menor reducció de pes fresc respecte les plantes tractades amb bromoxinil i una aplicació prèvia de malatió.



Figura 12: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 1ª fenologia tractades amb bromoxinil de la població B-013.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.



Figura 13: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2ª fenologia tractades amb bromoxinil de la població B-013.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.



Figura 14: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2ª fenologia tractades amb bromoxinil + malatió de la població B-013.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.

A la Figura 15, els resultats del percentatge de supervivència de la població tolerant B-017, mostren que es comporta com una població sensible, i no presenta major resistència respecte la població B-013. Per la població B-017, es pot observar al gràfic de supervivència, que les plantes de primera fenologia tractades amb l'herbicida bromoxinil són les que presenten un major percentatge de supervivència a dosis baixes, tot i que a partir d'una dosis de 100 g i.a/ha s'incrementa el percentatge de mortalitat fins a arribar a un 15% de supervivència a una dosis de 400 g i.a/ha, obtenint un 100% de mortalitat a una dosis de 750 g i.a/ha. Pel que fa als tractaments en plantes de segona fenologia amb una aplicació de bromoxinil i amb una aplicació prèvia o no de malatió, a diferència de les anteriors poblacions, a dosis baixes es produeix un major percentatge de mortalitat respecte el tractament fet en plantes de primera fenologia. A mesura que es va incrementant la dosis de bromoxinil, els resultats obtinguts del tractament de bromoxinil amb una aplicació prèvia de malatió mostren que a una dosis de 170 g i.a/ha, s'obté un 75% de supervivència de les plantes tractades obtenint el mateix percentatge de supervivència que en les plantes de primera fenologia tractades només amb bromoxinil. En el cas de les plantes de segona fenologia tractades amb bromoxinil, es pot observar en el gràfic que fins a una dosis de 250 g i.a/ha és l'aplicació més efectiva presentant un major percentatge de mortalitat de les plantes tractades. A partir d'aquesta dosis, perd efectivitat, obtenint un percentatge de supervivència superior a les plantes tractades amb primera fenologia, i finalment a una dosis de 850 g i.a/ha acaba presentat un 100% de mortalitat igual que les plantes de primera fenologia tractades amb bromoxinil. En aquesta població, el tractament de bromoxinil i una aplicació prèvia de malatió, ha resultat ser el menys eficient.

En el gràfic del percentatge de reducció del pes fresc, s'observa la mateixa tendència que en el gràfic de supervivència, presentant una menor reducció del percentatge de pes fresc en les plantes de primera fenologia fins a una dosi de 200 g i.a/ha, a partir del qual es canvia la tendència, i passen a tenir un menor percentatge de reducció del pes fresc les plantes de segona fenologia, essent el tractament amb una aplicació prèvia de malatió el que presenta un percentatge de reducció del pes fresc més baix.

A la població B-017 s'ha estimat valors negatius del percentatge de reducció del pes fresc (increment per tant) a les plantes de 1ª fenologia (desenvolupament de 4-6 fulles verdaderes) a una dosi de 1/8X (49,50 g i.a/ha) i 1/4X (99 g i.a/ha, i en plantes de 2ª fenologia (desenvolupament de 6-8 fulles verdaderes) a una dosi de 1/8X (49,50 g i.a/ha).

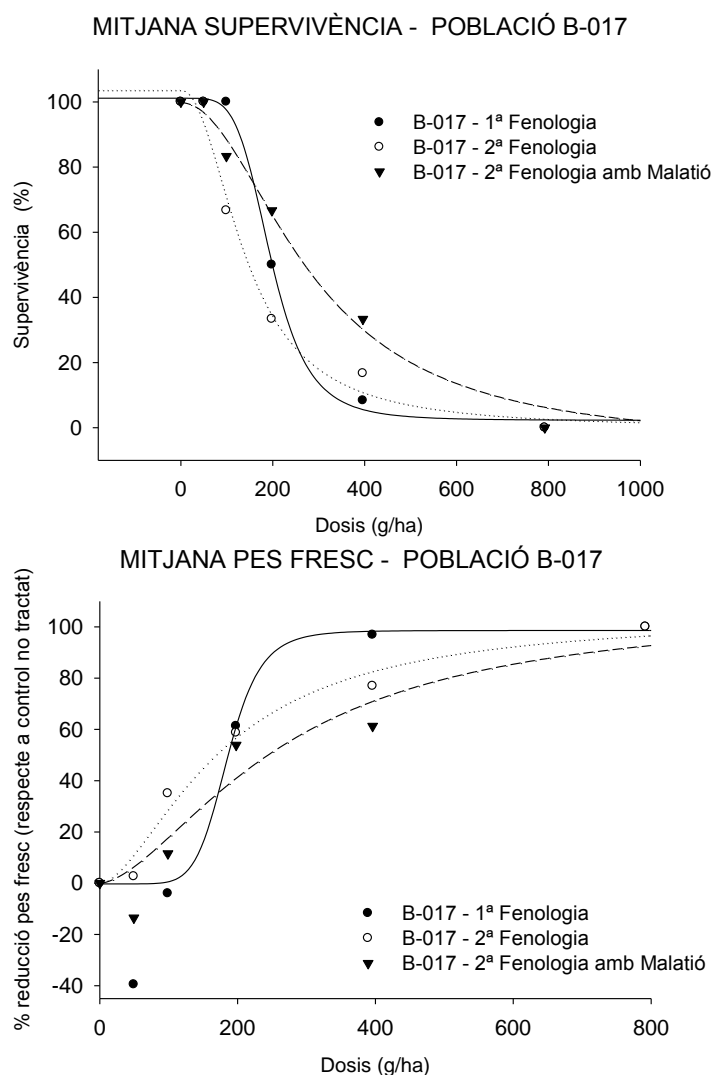


Figura 15: Gràfiques on es mostren els ajustos sigmoïdals per supervivència (gràfica superior) i per % de la reducció del pes fresc (gràfica inferior) de la població tolerant B-017 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1ª fenologia, cercles negres i línia contínua; Bromoxinil en plantes de 2ª fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatió en plantes de 2ª fenologia, triangles negres i línia discontinua.

A les fotografies fetes dels diferents tractaments de la població B-017 (Figures 16, 17 i 18), es pot observar que el tractament que ha mostrat més resistència a l'herbicida va ser l'aplicació de bromoxinil amb una aplicació prèvia de malatió (Figura 18).

Els resultats estadístics de la població B-017 ens mostren que l'aplicació de bromoxinil a les plantes de segona fenologia presentaven una major sensibilitat al producte respecte les plantes de primera fenologia. Aquest fet no s'observa de forma tan clara en les imatges posteriors, ja que les plantes escollides com a representatives per fer les fotografies no corroboren aquest fet.



Figura 16: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 1ª fenologia tractades amb bromoxinil de la població B-017.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.



Figura 17: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2ª fenologia tractades amb bromoxinil de la població B-017.

Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.



Figura 18: Testos de les repeticions representatives de cada una de les dosis estudiades en plantes de 2^a fenologia tractades amb bromoxinil + malatió de la població B-017.

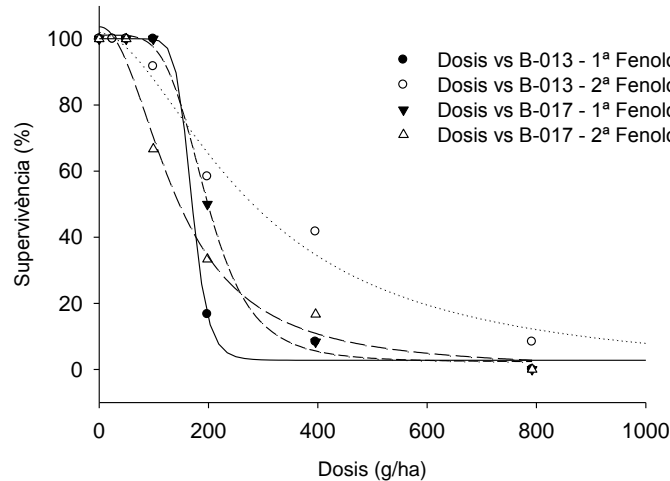
Font: Fotografia feta durant el desenvolupament de l'experiment.

Al gràfic comparatiu entre les dues poblacions tolerants a l'herbicide (Figura 19), es pot observar que a dosis baixes de l'herbicide bromoxinil el percentatge de supervivència és més elevat en plantes tractades de primera fenologia respecte les plantes tractades de segona fenologia. Quan la dosis s'augmenta fins a un 1/2X (198 g i.a/ha), el percentatge de mortalitat de les plantes de primera fenologia augmenta, al mateix temps que les plantes de segona fenologia es comporten com un fenotip més resistent, mostrant una pendent menys pronunciada que indica que el percentatge de supervivència de la població es manté més elevat. Per aquesta dosis la població B-013 presenta un 75% de supervivència i la població B-017 un 40%. Finalment, a una dosis de 600 g i.a/ha les plantes tractades de primera fenologia de les dues poblacions presenten un 100% de mortalitat i les plantes tractades de segona fenologia un 25% de supervivència per la població B-013 i un 5% per la població B-017. Davant d'aquests resultats es pot observar clarament que les plantes de segona fenologia es comporten de forma més tolerant a l'herbicide, la qual cosa fa que sigui necessari més dosis de producte per obtenir el mateix percentatge de mortalitat que en plantes de primera fenologia. Tampoc s'observa un increment de la tolerància o resistència de la població B-017 respecte a la població B-013 (la població B-017 és descendent de la població B-013).

Si s'observen les corbes del model de regressió no lineal del gràfic del pes fresc de les poblacions B-013 i B-017, es veu clarament la diferència entre el comportament de les plantes de primera i segona fenologia tractades amb bromoxinil. Les corbes de les plantes de primera fenologia de les dues poblacions mostren una pendent molt pronunciada, passant de tenir un 0% de reducció de pes fresc entre unes dosis de 99 i 110 g i.a/ha a tenir un 100% de reducció de pes entre unes dosis de 380 i 400 g i.a/ha.

A diferència d'aquests, les plantes de segona fenologia de les dues poblacions, no presenten una pendent tant pronunciada i la reducció del pes fresc va augmentant progressivament amb l'augment de la dosi de bromoxinil aplicada.

SUPERVIVÈNCIA PRIMERA I SEGONA FENOLOGIA - POBLACIONS B-013 I B-017



PES FRESC PRIMERA I SEGONA FENOLOGIA - POBLACIONS B-013 I B-017

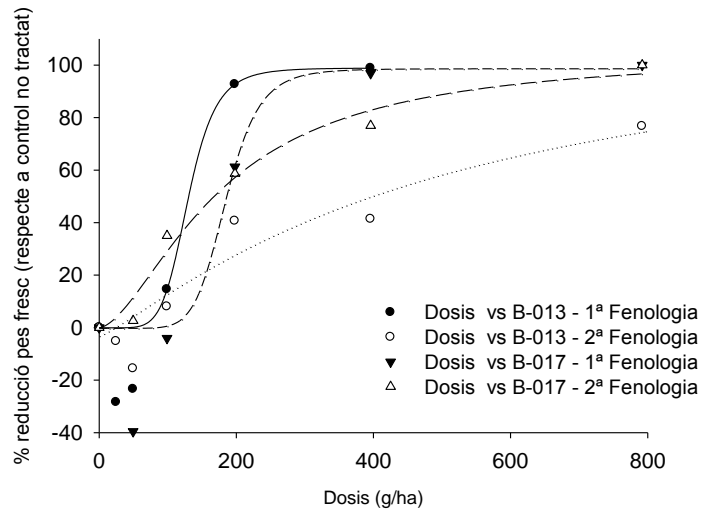


Figura 19: Gràfiques on es mostren els ajustos sigmoïdals per supervivència (gràfica superior) i per % de la reducció del pes fresc (gràfica inferior) de les poblacions tolerants B-013 i B-017 per dos tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1ª fenologia de la població B-13, cercles negres i línia continua; Bromoxinil + malatió en plantes de 2ª fenologia de la població B-013, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil amb plantes de 1ª fenologia de la població B-17, triangles negres i línia fina discontinua; Bromoxinil + malatió en plantes de 2ª fenologia de la població B-017, triangles blancs i línia discontinua més gran.

4.1. Resultats: Estudi econòmic

A partir dels resultats obtinguts de l'assaig desenvolupat en aquest treball, s'ha elaborat un estudi econòmic del cost que suposa el control de la rosella amb tractaments de post-emergència en un cultiu extensiu, a més de l'impacte mediambiental que suposa.

A continuació, a la Taula 4, es mostra el cost econòmic que suposa l'aplicació de l'herbicida bromoxinil pel control de rosella en plantes amb un estat fenològic de 1^a fenologia (14-16 BBCH (desenvolupament entre 4 i 6 fulles verdaderes) o de 2^a fenologia (16-18 BBCH (desenvolupament entre 6 i 8 fulles verdaderes). Els càlculs s'han fet depenent de la població estudiada i el factor de resistència que presenta respecte la població sensible de referència B-S113.

Taula 4: Càlculs econòmics del cost d'aplicació del producte depenent de la resistència (índex de resistència) que presenten les plantes de les poblacions sensibles (HS-S07 i B-S113) i poblacions tolerants (B-013 i B-017), amb primera o segona fenologia a l'herbicida bromoxinil amb les dades de supervivència i pes fresc. IR: índex de resistència.

Font: dades obtingudes del programa dels càlculs fets amb Microsoft Excel.

POBLACIÓ	FENOLOGIA	SUPERVIVÈNCIA			PES FRESC		
		IR	Cost d'aplicació del producte (€)	Increment del cost d'aplicació (%)	IR	Cost d'aplicació del producte (€)	Increment del cost d'aplicació (%)
HS-S07	1era	1,862	26,000		1,568	26,000	
	2ona	1,924	26,860	3,202	2,743	45,491	42,846
B-S113	1era	1,000	26,000	0,000	1,000	26,000	0,000
	2ona	1,000	26,000		1,000	26,000	
B-013	1era	0,940	26,000	22,925	0,858	26,000	74,358
	2ona	1,220	33,733		3,349	101,397	
B-017	1era	1,090	26,000	-76,502	1,225	26,000	10,936
	2ona	0,617	14,729		1,375	29,192	

Els resultats obtinguts de l'estudi econòmic mostren que l'aplicació del tractament herbicida en un estat fenològic més avançat suposa un increment del cost del tractament, degut a que les plantes amb un estadi vegetatiu més desenvolupat mostren un factor de resistència més elevat, és a dir, presenten més tolerància a l'herbicida.

En el cas de la població sensible HS-S07, el fet d'efectuar l'aplicació de l'herbicida bromoxinil quan les plantes es troben en un estat fenològic de 2^a fenologia, suposa un increment del cost del tractament d'un 23% respecte l'aplicació del tractament en plantes amb un estat fenològic de 1^a fenologia.

En el cas de la població tolerant B-013, la diferència entre el cost d'aplicació en plantes de 1^a o 2^a fenologia és superior a la població HS-S07, incrementant un 49% el cost del tractament si s'aplica en plantes de 2^a fenologia respecte de si s'aplica en plantes de 1^a fenologia.

En la població tolerant B-017, l'increment del cost d'aplicació en plantes de segona fenologia és d'un 11%, la qual cosa ens indica que, un tractament que suposaria un cost de 26€/ha si es fes quan les plantes es trobessin en un estat fenològic 14-16 de la escala BBCH (desenvolupament entre 4 i 6 fulles verdaderes), s'incrementaria a 29,19 €/ha pel fet de no haver aplicat en el moment oportú i que les plantes es trobessin en un estat fenològic més avançant.

5. DISCUSSIÓ

Les resistències a herbicides són i seran un dels reptes més importants pels productors. Els problemes de resistència que algunes males herbes han desenvolupat a determinats herbicides, són conseqüència derivada d'un mal ús dels mètodes de control. L'elevada pressió de selecció provocada per la continua aplicació del mateix herbicida pel maneig de certes espècies infestants, ha propiciat el desenvolupament de biotips de males herbes que deixen de ser controlades per un determinat producte al que originàriament eren susceptibles (Rey-Caballero & Montull, 2014). La millor manera de moderar l'evolució i propagació d'aquestes resistències, és implementar sistemes de cultiu diversificats que no es basin únicament en la utilització reiterada d'una única matèria activa per al control d'una espècie concreta, i sempre que sigui possible, donar prioritat a les pràctiques de maneig no químiques (Beckie et al., 2006). Tot i així, la problemàtica amb el control de les males herbes no sempre es deguda a que un biotip hagi desenvolupat resistència a un herbicida, i s'han de tenir en compte altres factors com pot ser una mala aplicació dels productes o una aplicació en un estat fenològic en el qual la mala herba es mostra més tolerant a l'herbicida. Resumint els objectius i mètodes de treball, aquest projecte es basa en estudiar si la problemàtica amb el control de rosella amb bromoxinil és deguda a una possible resistència múltiple a l'herbicida que podem trobar en un biotip de rosella i esbrinar la potencial funció de l'enzim citocrom P450 en la resistència a aquest herbicida, o si és deguda al fet de dur a terme les aplicacions en uns moments en els quals la mala herba es mostra més tolerant a l'herbicida.

Els resultats obtinguts de l'assaig de dosis-resposta mostren que els valors del paràmetre S50 i PF50 i del IR de les avaluacions de supervivència i de pes fresc, presenten uns resultats similars entre les diferents poblacions estudiades (sensibles i potencialment resistents), el que ens indica que en aquest assaig les quatre poblacions estudiades s'han comportat com a poblacions sensibles, i que per tant, no hi ha un factor de resistència en les poblacions considerades potencialment resistents (B-013 i B-017). Els IR entre poblacions han estat molt similars, amb valors propers a 1, sense observar-se diferències entre les poblacions sensibles al bromoxinil i les potencialment resistents. Un aspecte a ressaltar dels resultats obtinguts en ambdues avaluacions, és que la població sensible HS-S07 mostra un increment en la dosis necessària de producte per obtenir la mortalitat d'un 50% de la població i un factor de resistència superior a la població sensible B-S113, un fet que també s'ha observat en estudis previs desenvolupats amb les poblacions sensibles HS-S07 i B-S113, on amb altres modes d'acció, la població HS-S07 s'ha comportat de forma més tolerant respecte la població B-S113 (Rey-Caballero et al., 2017a). Pel que fa al pes fresc, tot i observar-se més variabilitat entre els resultats obtinguts en quant al paràmetre PF50 i al IR (valors entre 0,8 i 4), no s'observa resistència en les poblacions, ja que és la població sensible HS-S07 en plantes de segona fenologia la que presenta uns valors més elevats.

Recentment, la manca de control de la rosella s'ha descrit en alguns camps d'Espanya on es van aplicar barreges en post-emergència que contenen bromoxinil (Kaloumenos, 2014). Tot i així, fins al moment, no s'ha pogut afirmar que hi hagués resistència dels biotips de rosella a l'herbicida bromoxinil (Rey-Caballero et al., 2015), el que fa pensar que els resultats obtinguts a l'assaig segueixen la tendència dels diferents assajos desenvolupats fins al moment, i que la falta de control és deguda a algun altre factor que no és la resistència, com pot ser el moment d'aplicació, ja que les recomanacions sobre l'ús de les dosis d'herbicides es basen en les etapes de creixement de les males herbes trobades en el moment de l'aplicació (Cirujeda et al., 2008). Hi ha estudis que han demostrat que l'eficàcia de bromoxinil depèn de la fase fenològica (Corbett et al., 2004). A més, també s'ha de tenir en compte que trobar plantes amb resistència a nitrils és poc probable ja que fins al moment s'han descrit pocs casos de resistència a nitrils (Heap, 2019) i només se n'ha trobat tres espècies a tot el món (*Senecio vulgaris*, *Amaranthus hybridus* i *Amaranthus retroflexus*), el que demostra que la probabilitat de que la rosella sigui resistent al bromoxinil és baixa perquè a nivell mundial la resistència als nitrils no ha evolucionat.

Entre les poblacions tolerants a l'herbicida bromoxinil (B-013 (original) i B-017 (descendents)), en cada un dels diferents estats fenològics, no s'ha observat diferències en el paràmetre S50 i PF50 ni en la resposta del IR en percentatge de supervivència ni de reducció del pes fresc, demostrant que la possible resistència al bromoxinil no és un caràcter heretable. En el cas que les plantes tinguessin una certa resistència al bromoxinil, al no ser un caràcter heretable, no es podria considerar resistència ja que no es transmetria de generació en generació, amb la qual cosa no es passaria a les següents generacions i acabaria desapareixent, ja que la resistència s'entén com l'habilitat/aptitud heretable d'una espècie vegetal a sobreviure i reproduir-se després del tractament d'un herbicida a dosis normalment letals per la mateixa espècie susceptible (HRAC, 2019).

Per tant, podem concloure que no hi ha resistència a l'herbicida bromoxinil en les poblacions estudiades B-013 i B-017, i que a més no és un caràcter heretable.

Un aspecte que si que s'ha observat i és un factor a tenir en consideració, és el percentatge d'efectivitat del producte depenent del moment d'aplicació. Les diferents mides de creixement de les males herbes trobades en el moment de l'aplicació és una font de variabilitat que produeix una variació en la quantitat d'herbicida que arriba per unitat de pes o àrea foliar de les plantes diana. Això pot produir un "efecte diluent" de l'herbicida en les males herbes germinades primer (plantes més grans), promovent condicions subletals (Vila-Aiub & Ghersa, 2005). Els resultats obtinguts de les avaluacions de supervivència i pes fresc de les quatre poblacions estudiades, demostren que l'aplicació de l'herbicida en plantes de 1^a fenologia té un major percentatge d'efectivitat respecte l'aplicació en plantes de 2^a fenologia, les quals mostren una major tolerància i és necessari un augment de la dosis d'aplicació per obtenir el mateix percentatge de mortalitat, el que ens indica que les plantes amb un estat fenològic més avançat es comporten de manera més tolerant a l'herbicida bromoxinil. Els valors obtinguts en l'S50 i PF50 i en el IR mostren que tant en l'avaluació de supervivència com de pes fresc, les plantes de segona fenologia presenten uns IR (o tolerància per ser més precisos) més grans respecte les plantes de primera fenologia. Estudis recents desenvolupats en diferents espècies han demostrat que l'eficàcia de l'herbicida bromoxinil depèn de la fase fenològica (Corbett et al., 2004; Forcella et al., 2015). En el cas de la rosella, no sé sap fins a quin punt la mida de la planta pot afectar l'eficàcia del bromoxinil. Per tant, per estudiar una possible resistència al bromoxinil en rosella, és important saber si de fet, les queixes de manca de control són derivades de la presència de plantes massa grans en el

moment del tractament, com per exemple, fruit d'una aplicació tardana. El moment d'aplicació també és un factor a considerar, ja que modificant el moment de la intervenció química evitem possibles adaptacions germinatives (Caballero & Montull, 2014).

Pel que fa referència a l'aplicació de l'insecticida malatió, no s'ha observat una resposta fenotípica diferent en cap de les quatre poblacions estudiades en un estat fenològic més avançat. Això demostra que l'insecticida malatió en les poblacions HS-S07, B-S113, B-013 i B-017 de rosella no reverteix el fenotip de tolerant a sensible, i per tant el citocrom P450 no seria el responsable de la degradació del bromoxinil. O com a mínim, no en seria responsable un citocrom P450 que pugui ser inhibit pel malatió dins de la seva família. Així doncs, no es podria considerar que el citocrom P450 estigui involucrat en la resposta tolerant al bromoxinil en aquestes poblacions de rosella (la possible degradació del bromoxinil) en fenologies més avançades, ja que en aquest assaig no s'ha observat que el malatió inhibeixi el citocrom P450. Tot i així, sé sap que aquest enzim és responsable de processos de degradació de xenobiòtics i d'herbicides en particular en plantes, i en males herbes resistents a herbicides en particular (p. e. Hamouzová et al., 2013; Torra et al., 2017a). El fet que en aquest assaig les plantes de segona fenologia hagin presentat certa tolerància a l'herbicida però que no es pugui atribuir al citocrom P450, fa que s'intueixi que hi pugui haver algun altre enzim o procés que augmenti la tolerància al bromoxinil en plantes més grans, però que en aquest moment es desconeix quin és.

Els resultats obtinguts del pes fresc mostren que a dosis baixes (24,75 g i.a/ha, 49,50 g i.a/ha i 99 g i.a/ha) de l'aplicació de l'herbicida bromoxinil les plantes presenten un major desenvolupament de la tija i les fulles, provocant que el pes fresc de les plantes sigui superior al del testimoni. És per aquest motiu, que en les figures 7, 11, 15 i 19 hi ha valors negatius en la percentatge de reducció del pes fresc a les dosis més baixes (<100 g i.a/ha). Això podria ser degut a un fenomen anomenat hormesis. L'hormesis és un fenomen que es caracteritza per l'estimulació a dosis baixes d'un herbicida i una inhibició a dosis altes del creixement de les plantes. L'hormesis s'observa habitualment a dosis subletals d'herbicides i altres fitotoxines. L'aparició i la magnitud d'aquest fenomen està influenciada per l'etapa de creixement de la planta i l'estat fisiològic, els factors ambientals i el temps entre tractaments (Belz & Duke, 2014). En les imatges (Figures 8, 9, 10, 13, 16, i 18) s'observa aquest fenomen d'hormesis, on les plantes tractades a dosis baixes (24,75 g i.a/ha, 49,50 g i.a/ha i 99 g

i.a/ha), presenten un major desenvolupament de la mala herba respecte les del testimoni sense tractar.

En estudis previs s'ha observat que el bromoxinil a dosis baixes estimula el creixement radicular però no de la part aèria (Belz & Duke, 2014), al contrari que l'observat en aquest estudi, on segurament es van produir els dos efectes sobre les plantes de rosella. Probablement, en aquest assaig es va estimular el creixement radicular i això va provocar el major creixement de la part aèria. També cal destacar que els estudis anomenats anteriorment són amb *Avena sativa*, una gramínia, i en cap cas amb *P. rhoeas* o una altra dicotiledònia.

També hi ha estudis que demostren que la capacitat de resposta amb un fenomen d'hormesis pot resultar a favor i ajudar en determinades espècies a l'evolució de la resistència a dosis baixes d'herbicides (Belz, 2018), cosa que no s'ha observat en aquest treball. Tot i així, aquest risc de desenvolupar resistència demostra la importància de fer el tractament de post-emergència amb bromoxinil en el moment adequat i no retardar-lo en el cas de la rosella.

Durant el desenvolupament de l'assaig, es van produir problemes experimentals com són el percentatge i la velocitat de germinació de les llavors de les diferents poblacions estudiades i la dificultat en tenir dos estadis fenològics diferenciats en cada una de les poblacions, el que pot haver produït desviacions en els resultats finals obtinguts de l'assaig. El procés de germinació de les diferents poblacions estudiades va ser molt irregular, degut a que hi va haver poblacions que van tenir un procés de germinació molt ràpid (p.e. HS-S07), poblacions que van tenir un procés de germinació més lent (p.e. B-S113 i B-013) i poblacions que van tenir certes dificultats en el procés de germinació fins al punt que no van arribar a germinar i es van haver de sembrar per segona vegada (p.e. B-017). Això va condicionar el creixement de les plantes de cada una de les poblacions, dificultant que totes les poblacions tinguessin dos estats fenològics ben diferents, ja que una possible germinació precoç pot haver afavorit el tenir plantes més grans i amb dos estadis fenològics ben diferenciats, i una possible germinació tardana, va condicionar a tenir unes plantes més petites amb uns estadis fenològics menys diferenciats. No obstant això, és molt poc probable trobar etapes fenològiques uniformes dins de les poblacions de males herbes en condicions de camp sobretot, especialment en espècies com la rosella que tenen un període de germinació prolongat (Cirujeda et al., 2008).

Un exemple d'aquests problemes experimentals el trobem a la població HS-S07 que va germinar més ràpid respecte les altres poblacions, el que pot haver produït que les plantes estiguessin més desenvolupades respecte la resta de biotips i això pogués interferir en els resultats finals de l'assaig, fent que les plantes d'aquesta població necessitessin una dosi més elevada respecte a les altres. Un segon exemple, el podem trobar en el cas de la població B-017 on no s'observa d'una forma tant clara la diferència en la tolerància que presenten les plantes de 2^a fenologia respecte les de 1^a fenologia. Això pot ser degut a que les plantes de la població B-017, al tenir dificultats per germinar i ser sembrades per segona vegada, tinguessin les dues fenologies poc diferenciades.

5.1. Discussió: Estudi econòmic

En l'agricultura, per poder obtenir uns rendiments competitius i que garanteixin una òptima producció per fer front als costos que suposa el maneig del cultiu, és necessari, sovint, l'ús dels productes químics i dels herbicides. Avui en dia, l'aplicació d'herbicides és l'estratègia més utilitzada per evitar que les males herbes no infestin els cultius (Harker & O'Donovan, 2013). Tot i així, si no se'n fa un ús racional, algunes males herbes tenen la capacitat d'evolucionar i desenvolupar resistència a alguns dels herbicides emprats per al seu control. A més, aquestes espècies resistents poden arribar a provocar un increment a curt/llarg termini dels costos de producció i de gestió de les males herbes com a conseqüència de: una pèrdua de rendiments del cultiu, una reducció dels preus de venda degut a la contaminació dels productes per les llavors de les males herbes, una pèrdua en el valor de les finques i inclús l'abandonament de les mateixes i, finalment, un cost addicional en la utilització d'herbicides alternatius per la gestió d'aquestes poblacions resistents (Caballero & Montull, 2014).

Com s'ha esmentat, les poblacions de rosella amb resistència múltiple als herbicides del grup O i grup B són habituals a les nostres contrades (Rey-Caballero et al., 2016; 2017a), i els herbicides utilitzats per al seu control són sovint de post-emergència. Els mecanismes d'acció dels herbicides disponibles en pre-emergència són diferents, per la qual cosa són encara una bona alternativa per al control d'aquestes poblacions (Torra et al., 2010).

En el cas de rosella, el fet que aquesta mala herba hagi desenvolupat resistència als principals productes utilitzats pel seu control (2,4-D i tribenuron-metil), ha fet augmentar el cost del tractament entre 136% i 189%, depenent del producte utilitzat.

Això demostra que el fet que les males herbes al llarg del temps presentin resistència als herbicides, degut al maneig que s'ha dut a terme durant els darrers anys pel seu control, condiciona els productes disponibles per combatre-les, reduint el ventall de productes disponibles i encarint el tractament.

Un altre factor a tenir en compte per poder obtenir la màxima eficàcia del producte amb el mínim cost possible, tal i com s'ha demostrat en els resultats obtinguts de l'assaig amb l'herbicida bromoxinil, és el moment d'aplicació del producte (Corbett et al., 2004).

Aquests resultats obtinguts ens mostren que és important el moment d'aplicació de l'herbicida bromoxinil, per obtenir la màxima eficàcia del producte amb el mínim cost possible i el mínim impacte ambiental, ja que el fet de fer el tractament en un estat fenològic avançat ens pot incrementar de mitja entre un 10% i un 48,7% el cost del tractament en funció de la població.

6. CONCLUSIONS

Es poden extreure les següents conclusions dels resultats exposats anteriorment:

- No es pot confirmar la resistència de les poblacions B-013 i B-017 a l'herbicida bromoxinil.
- No s'observa heretabilitat del factor de resistència entre la població B-013 (1^a generació) i la població B-017 (3^a generació) a l'herbicida.
- L'insecticida malatió no va revertir el fenotip de les poblacions B-013 i B-017 de resistent a sensible, ni va provocar que les poblacions HS-S07 i B-S113 es mostressin encara més sensibles. Això fa que no es pugui confirmar que l'enzim citocrom P450 sigui responsable de la degradació de l'herbicida.
- Les plantes de *Papaver rhoeas* d'una fenologia més avançada presenten una major tolerància a l'herbicida bromoxinil i és necessari un augment de la dosis d'aplicació per obtenir el mateix percentatge de mortalitat de la població.
- El citocrom P450 no seria el responsable de la major tolerància a l'herbicida bromoxinil en plantes amb una fenologia més avançada.
- S'ha observat un possible fenomen d'hormesis a dosis baixes de l'herbicida bromoxinil en la mala herba *Papaver rhoeas*.
- La resistència que ha desenvolupat la mala herba *Papaver rhoeas* als principals herbicides que s'utilitzen per al seu control, ha provocat que s'incrementés entre 136 i 189% el cost econòmic que suposa l'aplicació dels tractaments herbicides per obtenir el mateix nivell de control.
- El moment d'aplicació de l'herbicida bromoxinil és un factor a considerar, per obtenir la màxima eficàcia del producte amb el mínim cost possible i el mínim impacte ambiental, ja que el fet de fer el tractament en un estat fenològic avançat ens pot incrementar de mitja un 28% el cost del tractament en funció de la població.

7. ANNEX

AVALUACIÓ PES SEC DE LA PART AÈRIA DE LES PLÀNTULES

Taula 5: Paràmetres de les corbes sigmoïdals de les dades de reducció del pes sec (%) de dues poblacions sensibles (HS-S07 i B-S113) i dues poblacions potencialment resistents a bromoxinil (B-013 i B-017) de rosella. Es mostren els resultats de dues fenologies (primera, 1era; segona, 2ona), i per la 2ona, també amb l'aplicació prèvia de malatió IR: índex de resistència.

POBLACIÓ	FENOLOGIA	TRACTAMENT	PS50	ERROR ESTÀNDARD	PENDENT	MÀXIM	MÍNIM	P	R ² AJUSTADA	IR
HS-S07	1era	bromoxinil	168,476	9,841	2,652	96,415	-1,126	0,002	0,996	1,138
	2ona	bromoxinil	248,681	19,881	1,136	101,043	0,000	0,002	0,995	2,383
	2ona	Bromoxinil + malatió	265,211	40,370	0,719	106,330	0,000	0,002	0,995	2,542
B-S113	1era	bromoxinil	147,927	0,651	4,746	100,027	-0,180	0,000	1,000	1,000
	2ona	bromoxinil	104,313	9,707	3,205	98,928	0,000	0,013	0,977	1,000
	2ona	Bromoxinil + malatió	171,536	29,363	2,119	101,803	0,000	0,023	0,961	1,644
B-013	1era	bromoxinil	101,649	1,290	5,533	97,253	-0,579	0,000	0,999	0,687
	2ona	bromoxinil	74,037	5,831	4,839	60,758	-4,056	0,001	0,985	0,709
	2ona	Bromoxinil + malatió	118,594	27,880	1,897	91,853	0,000	0,003	0,927	1,136
B-017	1era	bromoxinil	148,974	4,961	3,030	101,108	-1,419	0,001	0,998	1,007
	2ona	bromoxinil	132,375	26,119	1,347	100,122	0,000	0,018	0,969	1,269
	2ona	Bromoxinil + malatió	151,613	48,104	1,656	96,342	0,000	0,061	0,897	1,453

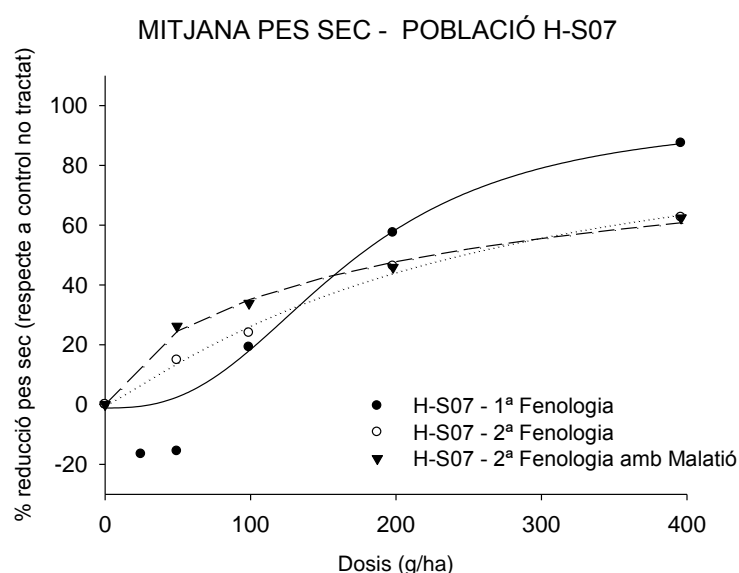


Figura 20: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes sec de la població sensibles HS-S07 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1ª fenologia, cercles negres i línia continua; Bromoxinil en plantes de 2ª fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatió en plantes de 2ª fenologia, triangles negres i línia discontinua.

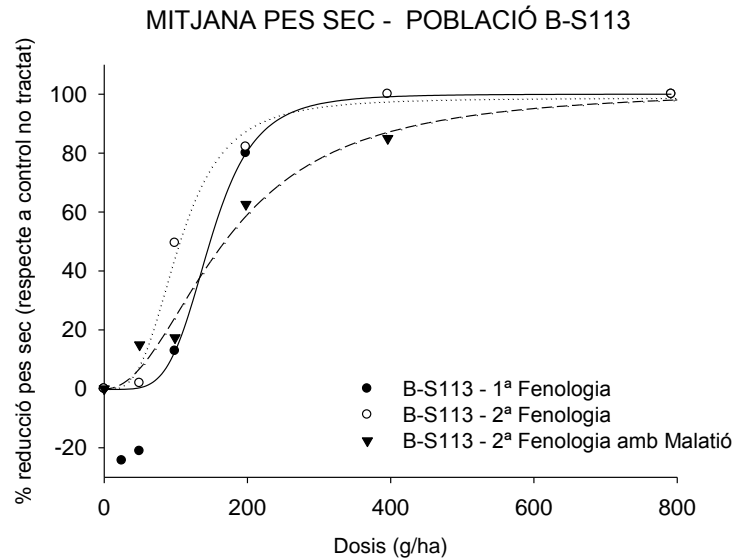


Figura 21: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes sec de la població sensible B-S113 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1ª fenologia, cercles negres i línia contínua; Bromoxinil en plantes de 2ª fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatí en plantes de 2ª fenologia, triangles negres i línia discontinua.

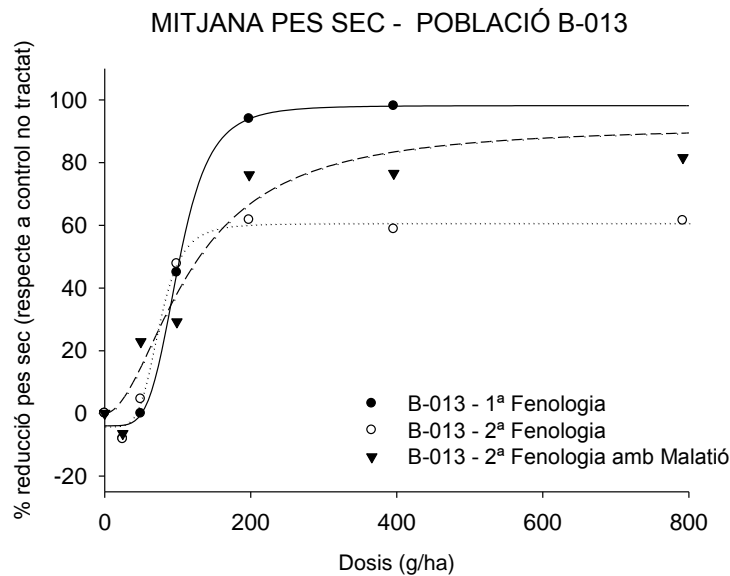


Figura 22: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes fres de la població tolerant B-013 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1ª fenologia, cercles negres i línia contínua; Bromoxinil en plantes de 2ª fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatí en plantes de 2ª fenologia, triangles negres i línia discontinua.

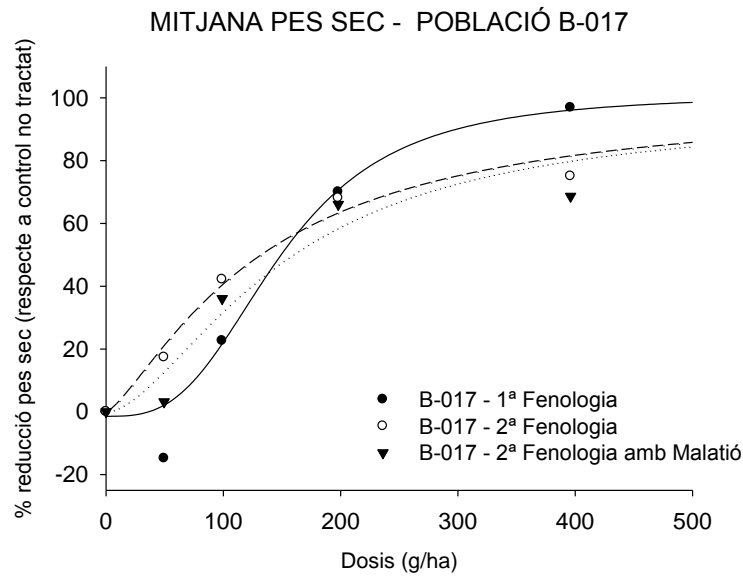


Figura 23: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes fres de la població tolerant B-017 per tres tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1ª fenologia, cercles negres i línia contínua; Bromoxinil en plantes de 2ª fenologia, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil + malatí en plantes de 2ª fenologia, triangles negres i línia discontinua.

PES SEC PRIMERA I SEGONA FENOLOGIA - POBLACIONS B-013 I B0-17

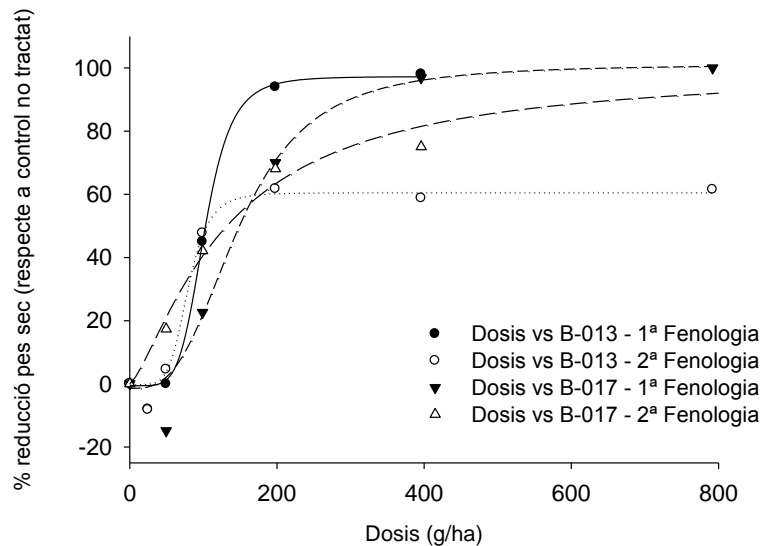


Figura 24: Gràfica on es mostren els ajustos sigmoïdals per % de la reducció del pes fres de les poblacions tolerants B-013 i B-017 per dos tractaments i dos fenologies: Bromoxinil en plantes de 1ª fenologia de la població B-13, cercles negres i línia contínua; Bromoxinil + malatí en plantes de 2ª fenologia de la població B-013, cercles blancs i línia puntejada; Bromoxinil en plantes de 1ª fenologia de la població B-17, triangles negres i línia fina discontinua; Bromoxinil + malatí amb plantes de 2ª fenologia de la població B-017, triangles blancs i línia discontinua més gran.

8. BIBLIOGRAFIA

AGUINAGALDE, I., HAMPE, A., MOHANTY, A., MARTÍN, J.P., DUMINIL, J., PETIT, R.P., (2005). Effects of 16 life-history traits and species distribution on genetic structure at maternally inherited markers in European trees and shrubs. *J Biogeogr*, 32, 329–339.

ANDERSON, W.P., (1996). *Weed Science: Principles and Applications*. 3rd ed. St. Paul, MN., West, 3–5, 39–66.

BECKIE, H.J., GILL, G.S., (2006). Strategies for managing herbicide-resistant weeds. In: Singh HP, Batish DR, Kohli RK (eds) *Handbook of sustainable weed management*. Haworth Press, Binghamton, 581–626.

BELZ, R.G., (2018). Herbicide hormesis can act as a driver of resistance evolution in weeds - PSII-target site resistance in *Chenopodium album* L. as a case study. *Pest Management Science*, 74 (12), 2874-2883.

BELZ, R.G., DUKE, S.O., (2014). Herbicides and plant hormesis. *Pest Management Science*, 70, 698-707.

CIRUJEDA, A., (2001). Integrated management of herbicide resistant *Papaver rhoeas* L. populations. Ph.D dissertation. Universitat de Lleida, Spain, 67.

CIRUJEDA, A., RECASENS, J., TABERNER, A., (2006). Dormancy cycle and viability of buried seeds of *Papaver rhoeas*. *Weed Research*, 46 (4), 327-334.

CIRUJEDA, A., RECASENS, J., TORRA, J., TABERER, A., (2008). A germination study of herbicide resistant field poppies in Spain. *French National Institute for Agricultural Research*, 28, 207 – 220.

CLAUDE, J.P., GABARD, J., DE PRADO, R., TABERNER, A., (1998). An ALS-resistant population of *Papaver rhoeas* in Spain. In *Proceedings of the Compte Rendu XVII Conference COLUMA, Journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes*, ANPP; Montpellier, 141-147.

CORBETT, JR., WRIGHT, R., BAILIE, AC., (1994). The biochemical mode of action of 46 pesticides, (eds. Academic Press, London), 382 p.

CORBETT, JL., ASKEW, SD., THOMAS, WE., WILCUT, JW., (2004). Weed efficacy evaluations for bromoxynil, glufosinate, glyphosate, pyriithiobac, and sulfosate. *Weed Technology*, 1, 443–453.

CRUZ-HIPOLITO, H., OSUNA, MD., VIDAL, RA., DE PRADO, R., (2009). Resistance mechanism to bensulfuron-methyl in biotypes of *Scirpus mucronatus* L. collected in Chilean rice fields. *J Agric Food Chem*, 57, 4273–8.

DÉLYE, C., (2005). Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Science*, 53, 728-746.

DÉLYE, C., PERNIN, F., SCARABEL, L., (2011). Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Science*, 180(2), 333–342.

DIEZ DE ULZURRUN, P., (2013). Modos de acción herbicida. Universidad Nacional de Mar del Plata. Congreso Aapresid (Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa), 52 p.

DUGGLEBY, RG., MC COURT, JA., GUDDAT, LW., (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology Biochemistry*, 46, 309–324.

DE PRADO, R., ROMERA, E., MENÉNDEZ, J., (1996). Chlortoluron resistance in a *Bromus tectorum* L. biotype is due to an enhanced detoxification processes. En: "Proceedings of the International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides" (eds. De 47 Prado, R.; Jorrín, J.; García-Torres L.; Marshall G), Universidad de Córdoba, España, 62-64.

DURÁN-PRADO, M., OSUNA, M.D., DE PRADO, R., FRANCO, A.R., (2004). Molecular basis of resistance to sulfonylureas in *Papaver rhoeas*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 79, 10-17.

FORCELLA, F., EBERLE, CA., GESCH, RW., JOHNSON, JMF., (2015). Oilseed cuphea tolerates bromoxynil. *Industrial Crops Production*, 70, 201–203.

GARCÍA-TORRES, L., FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, C., (1991). *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*, Mundi-Prensa, Madrid, 348p.

GRONWALD, JW., (1994). Resistance to photosystem II inhibiting herbicides, in *herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*, ed. by Powles SB and Holtum JAM. Lewis Publ Boca Raton, 27–60.

HAMILL, AS., HOLT, JS., MALLORY-SMITH, CA., (2004). Contributions of weed science to weed control and management. *Weed Technology*, 18, 1563–1565.

HAMOUZOVÁ, k., KOSNAROVÁ, P., SALAVA, J., SOUKUP J., HAMOUZ, P., (2013). Mechanisms of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Pes Management Science*, 70, 541-548.

HARKER, K., O'DONOVAN, J., (2013). Recent weed control, weed management, and integrated weed management. *Weed Technology*, 27, 1-11.

HEAP, I. (2019). The International Survey of Herbicide-Resistant Weeds. Available from: <http://www.weedscience.com>. Consultat el 9 de març 2019.

Herbicide Resistance Action Committee (HRAC). (2019). Recuperat de <http://hracglobal.com/> Consultat el 19 de gener 2019.

HESS, FD., (2000). Light-dependent herbicides: an overview. *Weeds Science*, 4, 160–170.

HESS, M., BARRALIS, G., BLEIHOLDER, H., BUHR, L., EGGERS, T., HACK, H., STAUSS, R., (1997). Use of the extended BBCH scale - general for the descriptions of the growth stages of mono; and dicotyledonous weed species. *Weed Research*, 37, 433-441.

HOLM, L., DOLL, J., HOLM, E., PANCHO, J., HERBERGER, J., (1997). *Papaver rhoeas* L. In world weed natural histories and distribution. eds Holm L, Doll J, Holm E, Pancho J, Herberger J. John Wiley & Sons, New York, 555–561.

International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Recuperat de <http://www.weedscience.org/Summary/ResistbyActive.aspx>. Consultat el 1 de març 2019.

KALOUMENOS, NS., DORDAS, CA., DIAMANTIDIS, GC., ELEFTHEROHORINOS, IG., (2009). Multiple Pro197 substitutions in the acetolactate synthase of corn poppy (*Papaver rhoeas*) confer resistance to tribenuron. Weed Science, 57, 362–368.

KALOUMENOS, N., (2014). Corn Poppy Resistance, a European Issue. In Proceedings of the Herbicide Resistance in Europa: challenges, opportunities and threats. EWRS Herbicide Resistant Working Group. Frankfurt am Main, 5.

MCNAUGHTON, IH., HARPER, JL., (1964). Biological flora of the British Isles. *Papaver* L. Journal of Ecology, 52, 767–793.

MITHILA, J., HALL, J., JOHNSON, G., KELLEY, B., RIECHERS, E., (2011). Evolution of Resistance to Auxinic Herbicides: Historical Perspectives, Mechanisms of Resistance, and Implications for Broadleaf Weed Management in Agronomic Crops. Weed Science, 59, 445 - 457.

NEVE, P., BUSI, R., RENTON, M., VILA-AIUB., MM., (2014). Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. Pest Management Science, 70, 1385–1393.

NORSWORTHY, J., WARD, S., SHAW, D., LLEWELLYN, R., NICHOLS, R., WEBSTER, T., BRADLEY, K., FRISVOLD, G., POWLES, S., BURGOS, N., WITT, W., BARRETT, M., (2012). Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. Weed Science, 60, 31-62.

OERKE, E. (2006). Crop losses to pests. Journal of Agricultural Science, 144, 31-43.

ORLOFF, SB., PUTNAM, DH., CANEVARI, M., LANINI, WT., (2009). Avoiding Weed Shifts and Weed Resistance in Roundup Ready Alfalfa Systems. UC ANR Pub 8362. Oakland, CA.

PRADO RUIZ-SANTAELLA, J.L., (2011). Mecanismos de resistencia a ureas-sustituidas, FOPS y Glicinas en *Lolium rigidum*. Universidad de Córdoba. Tesis doctoral 136 p.

RADOSEVICH, S., HOLT, J., GHERSA, C., (1997). Weed Ecology. Implications for Management, 589 p., John Wiley and Sons, New York.

REY-CABALLERO, J., MONTULL, J.M., (2014). Valoración económica del manejo integrado de resistencias en amapola y vallico. Revista Tierras nº 220 páginas 60-68.

REY-CABALLERO, J., MONTULL, J.M., TABERNER, A., TORRA, J., (2015). Estudio de sensibilidad al bromoxinil de un biotipo de *Papaver rhoeas*. Actas del XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, Sevilla. Volumen 1, 157-162.

REY-CABALLERO, J., (2016). Unravelling herbicide resistance in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.) to improve integrated weed management strategies. Universitat de Lleida. Tesis doctoral 123 p.

REY-CABALLERO, J., MENÉNDEZ, J., GINÉ-BORDONABA, J., SALAS, M., ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R., TORRA, J., (2016a). Unravelling the resistance mechanisms to 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in corn poppy (*Papaver rhoeas*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 133, 67-72.

REY-CABALLERO, J., TORRA-FARRE, J., RECASENS-GUINJUAN, J., (2016b). Manejo integrado de amapola (*Papaver rhoeas*) resistente; Situación actual y nuevas opciones de manejo integrado. Revista Tierras nº220 paginas 56-64.

REY-CABALLERO, J., MENÉNDEZ, J., OSUNA, MD., SALAS, M., TORRA, J., (2017a). Target-site and non-target-site resistance mechanisms to ALS inhibiting herbicides in *Papaver rhoeas*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 138, 57-65.

REY-CABALLERO, J., ROYO-ESNAL, A., RECASENS, J., GONZÁLEZ, I., TORRA, J., (2017b). Management options for multiple herbicide-resistant corn poppy (*Papaver rhoeas*) in Spain. *Weed Science*, 65, 295-304.

SCARABEL, L., CARRAO, N., SATTIN, N., VAROTTO, S. (2004). Molecular basis and genetic characterization of involved resistance to ALS-inhibitors in *Papaver rhoeas*. *Plant Science*, 166, 703-709.

SONG, Y., (2014) Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *Journal Integrative Plant Biology*, 56, 106–113.

TABERNER, A., ESTRUCH, F., SANMARTI, X., (1992). Balance de 50 años de control de malas hierbas. Punto de vista del agricultor/aplicador. In *Proceedings of the 3rd Spanish Weed Science Congress*. Spanish Weed Science Society, Spain, 13-48.

TABERNER, A., (2001). *Biología de Lolium rigidum* Gaud. Como planta infestante del cultivo de cebada. Aplicación al establecimiento de métodos de control. MS Thesis. Universidad de Lleida, Lleida. Spain, 86 p.

TIEBAS, MA., GASTÓN, S., ZABALZA, A., ROYUELA, M., (2001). Resistencia de dos biotipos de *Papaver rhoeas* a herbicidas del grupo B. *Actas Congreso 2001 de la Sociedad Española de Malherbología*, 123-126.

TORRA, J., RECASENS, J., (2008). Demography of corn Poppy (*Papaver rhoeas*) in Relation to Emergence Time and Crop Competition. *Weed Science*, 56, 826-833.

TORRA, J., CIRUJEDA, A., TABERNER, A., RECASENS, J., (2010). Evaluation of herbicides to manage herbicide-resistant corn poppy (*Papaver rhoeas*) in winter cereals. *Crop Protection*, 29, 731-736.

TORRA, J., ROYO-ESNAL A., RECASENS, J., (2011). Management of herbicide-resistant *Papaver rhoeas* in dry land cereal fields. *Agronomy for Sustainable Development*, 31, 483-490.

TORRA, J., REY-CABALLERO, J., (2017). Multiple herbicide resistance in corn poppy (*Papaver rhoeas*) populations from Spain. 7th International Weed Science Congress, 19-19. Praga, República Txeca.

TORRA, J., ROJANO-DELGADO, A.M., REY-CABALLERO, J., ROYO-ESNAL, A., SALAS, M., DE PRADO, R., (2017a). Enhanced 2,4-D metabolism in two resistant *Papaver rhoeas* populations from Spain. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1584.

TORRA, J., REY-CABALLERO, J., ROYO-ESNAL, A., SALAS, M., (2017b). Metabolismo mediado por citocromo P450 en biotipos de *Papaver rhoeas* resistentes a auxinas sintéticas. *Actas del XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología*. Pamplona-Iruña.

VILA-AIUB, MM., GHERSA, CM., (2005). Building up resistance by recurrently exposing target plants to sublethal doses of herbicide. *European Journal of Agronomy*, 22, 195–207.

WHALEY, CM., WILSON, HP., WESTWOOD, JH., (2007). A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS - inhibiting herbicides. *Weed Science*, 55, 83-90.

Weed Science Society of America (WSSA). (2019). Recuperat de <http://wssa.net/>. Consultat el 2 de febrer 2019.

YU, Q., POWLES, SB., (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science*, 70, 1340–50.

ZIMDAHL, R., (2007). *Fundamentals of weed sciences*. Elsevier. 689 p.